

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Bc. Michal Buša

Sekretované proteasy motolice jaterní a jejich interakce s endogenním inhibítozem

Secreted proteases of the liver fluke and their interaction with endogenous inhibitor

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultant: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Praha, 2013

ABSTRAKT

Motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) je jeden z nejvýznamnějších parazitů hospodářských zvířat, který infikuje i člověka. Proteolytický systém motolic je klíčový pro jejich interakci s hostitelem a proto představuje potenciální molekulární cíl pro vývoj nových vakcín. Diplomová práce byla zaměřena na proteasy sekretované dospělci *F. hepatica* a nový proteasový inhibitor FheCy2 z rodiny cystatinů. Proteolytická aktivita sekretovaných proteas byla analyzována pomocí: (a) chromogenních proteinových substrátů a fluorogenních peptidových substrátů, (b) selektivních proteasových inhibitorů, (c) fluorescenční aktivní značky umožňující vizualizaci proteas. Tyto výsledky ukázaly, že sekretované proteasy jsou cysteinové proteasy papainové rodiny, které patří mezi katepsiny typu L a B. V enzymologických testech bylo prokázáno, že FheCy2 je účinným inhibitorem těchto proteas. Lze předpokládat, že FheCy2 se účastní fyziologické regulace endogenních proteas sekretovaných dospělci *F. hepatica*, což z něj činí atraktivní protein pro vakcinační studii.

Klíčová slova: motolice jaterní, katepsiny, proteolytická aktivita, substrátová specifita, inhibitory proteas

ABSTRACT

The liver fluke, *Fasciola hepatica*, is one of the most important parasites of livestock, and it also infects humans. The proteolytic system of trematodes is critical for their interaction with the host and is a potential target for the development of novel vaccines. This work is focused on proteases secreted by *F. hepatica* adults and on FheCy2, a new protease inhibitor from the cystatin family. The proteolytic activity of the secreted proteases was analyzed using: (a) chromogenic protein substrates and fluorogenic peptide substrates, (b) selective protease inhibitors, and (c) a fluorescent activity-based probe for visualization of proteases. The results showed that the secreted proteases are cysteine proteases of papain family belonging to cathepsins L and B. These proteases were effectively inhibited by FheCy2 as demonstrated by enzymological analysis. It can be assumed that FheCy2 participates in the physiological regulation of endogenous proteases secreted by *F. hepatica* adults, which makes it attractive candidate protein for vaccination studies.

Key words: *Fasciola hepatica*, cathepsins, proteolytic activity, substrate specificity, protease inhibitors

(In Czech)

SEZNAM ZKRATEK

Abz	2-aminobenzoyl
AE	legumain
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
APS	peroxodisíran amonný
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	hovězí sérový albumin
CatB	catepsin B (z angl. „cathepsin B“)
CatC	catepsin C (z angl. „cathepsin C“)
CatD	catepsin D (z angl. „cathepsin D“)
CatL	catepsin L (z angl. „cathepsin L“)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleová (z angl. „deoxyribonucleic acid“)
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	analýza s enzymem navázaným na immunosorbent (z angl. „enzyme-linked immunosorbent assay“)
ESP	exkreční-sekreční produkty
FABP	protein vážící se na mastné kyseliny (z angl. „fatty-acid-binding protein“)

FPLC	rychlá proteinová kapalinová chromatografie (z angl. „fast protein liquid chromatography")
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie (z angl. „fluorescence resonance energy transfer)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. „human immunodeficiency virus")
HLA	lidské leukocytární antigeny (z angl. „Human Leukocyte Antigens")
HMW	vysokomolekulární látky (z angl. „high molecular weight")
HRP	protein bohatý na histidin (z angl. „histidine rich protein")
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
IC ₅₀	inhibiční koncentrace v polovině maximálního účinku
Ig	imunoglobulin
kDa	kilodalton
LAP	leucinová aminopeptidasa
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. „major histocompatibility complex")
MMTS	S-methyl methanthiosulfonát
Mr	relativní molekulová hmotnost
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza (z angl. „polyacrylamide gel electrophoresis")
PBS	pufrovací fyziologický roztok (z angl. „phosphate-buffered saline")

PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. „polymerase chain reaction“)
PEG	polyetylenglykol
pI	izoelektrický bod
PVDF	polyvinylidendifluorid
RFU	relativní fluoroscenční jednotky (z angl. „relative fluorescence units“)
RPM	otáčky za minutu (z angl. „revolutions per minute“)
RPMI	kultivační médium (z angl. „Roswell Park Memorial Institute medium“)
SCP	karboxypeptidasa
SDS	dodecylsulfát sodný
Suc	sukcinyl
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
Z	benzyloxykarbonyl

Zkratky aminokyselin:

A	Ala	alanin
R	Arg	arginin
N	Asn	asparagin
D	Asp	kyselina asparagová
C	Cys	cystein
Q	Gln	glutamin
E	Glu	kyselina glutamová
G	Gly	glycin
H	His	histidin
I	Ile	isoleucin
L	Leu	leucin
K	Lys	lysin
M	Met	methionin
F	Phe	fenylalanin
P	Pro	prolin
S	Ser	serin
T	Thr	threonin
W	Trp	tryptofan
Y	Tyr	tyrosin
V	Val	valin

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 7. 5. 2013

Podpis

Na tomto místě bych rád poděkoval RNDr. Michaeli Marešovi, CSc. za cenné rady, vstřícnost a ochotu při vypracovávání diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Zuzaně Kovářové za pomoc při řešení praktických i odborných problémů, za její trpělivost a milý přístup. V neposlední řadě děkuji všem ostatním členům laboratoře a vstřícnost a ochotu kdykoliv poradit. Za poskytnutý materiál děkuji Dr. Sašovi Štefaničovi (Univerzita Curych, Švýcarsko)

Na závěr bych chtěl poděkovat rodině a přítelkyni za podporu a trpělivost během celého studia.

OBSAH

1. Teoretický úvod	12
1.1. Motolice jaterní (<i>Fasciola hepatica</i>)	12
1.1.1. Základní charakteristiky motolice jaterní	12
1.1.2. Taxonomické zařazení motolice jaterní	13
1.1.3. Výskyt rodu <i>Fasciola</i>	14
1.1.4. Životní cyklus motolice jaterní	15
1.2. Fasciolóza	19
1.2.1. Obecný popis fasciolózy	19
1.2.2. Klinické příznaky fasciolózy	20
1.2.3. Diagnostika, prevence a léčba fasciolózy	21
1.3. Proteasy	23
1.3.1. Klasifikace proteas	23
1.3.2. Katalytický mechanismus cysteinových proteas	26
1.3.3. Substrátová specifita cysteinových proteas	28
1.3.4. Biologické funkce proteas	29
1.3.5. Trávicí proteasy z parazitů sajících krev	31
1.3.6. Proteasy z motolic rodu <i>Fasciola</i>	33
1.3.7. Exkreční-sekreční produkty motolice jaterní	33
1.4. Inhibitory proteas	34
1.4.1. Klasifikace inhibitorů proteas	35
1.4.2. Biologické funkce inhibitorů proteas	36
1.4.3. Proteasové inhibitory parazitů sajících krev	37
1.5. Cystatiny	38

1.5.1.	Klasifikace Cystatinů.....	38
1.5.2.	Struktura cystatinů a mechanismus inhibice.....	39
1.5.3.	Fyziologie Cystatinů	41
2.	Cíl práce	43
3.	Materiál a metody.....	44
3.1.	Materiál.....	44
3.1.1.	Rekombinantní cystatin z motolice jaterní.....	44
3.1.2.	Exkreční-sekreční produkty motolice jaterní.....	44
3.2.	Chemikálie.....	45
3.2.1.1.	Peptidové substráty	45
3.2.1.2.	Inhibitory	45
3.2.1.3.	Ostatní chemikálie.....	46
3.2.2.	Přístroje a vybavení	46
3.3.	Metody.....	48
3.3.1.	Chromatografické metody	48
3.3.1.1.	Gelová chromatografie na koloně Sephadex G-25	48
3.3.1.2.	Iontoměničová chromatografie na koloně Mono Q	48
3.3.1.3.	Afinitní chelatační chromatografie	49
3.3.1.4.	Gelová chromatografie na koloně Superdex 75	50
3.3.2.	Precipitační metody.....	50
3.3.2.1.	Acetonová precipitace proteinů	50
3.3.3.	Analytické metody	51
3.3.3.1.	Stanovení obsahu proteinů ve vzorku	51
3.3.3.2.	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS.....	51
3.3.3.3.	Přenos proteinů na membránu.....	52

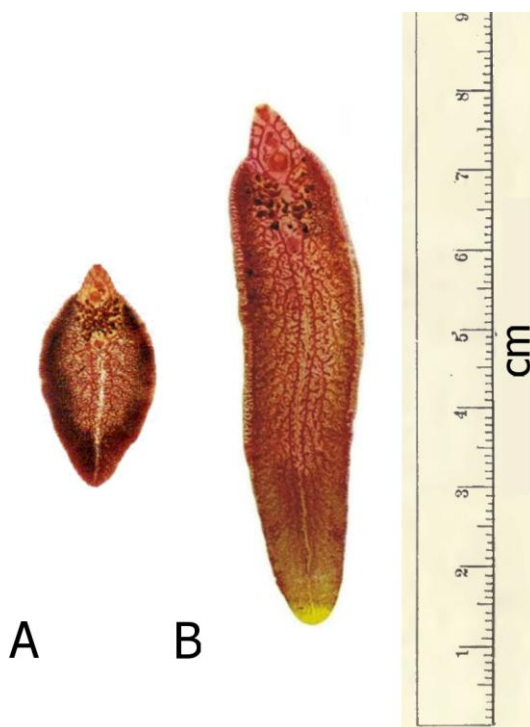
3.3.3.4.	Určení N-koncové sekvence aminokyselin	52
3.3.3.5.	Značení pomocí aktivní fluorescenční značky	52
3.3.4.	Měření enzymových aktivit	53
3.3.4.1.	Proteolytická aktivita s nespecifickými proteinovými substráty	53
1.1.1.1.	Proteolytická aktivita s fluorogenními peptidovými substráty	55
3.3.4.2.	Určení inhibičních parametrů FheCy2	57
4.	Výsledky	60
4.1.	Izolace rekombinantního cystatinu FheCy2 z <i>F. hepatica</i>	60
4.1.1.	Příprava proteinové frakce pomocí gelové chromatografie.....	60
4.1.2.	Afinitní separace FheCy2 pomocí chelatační chromatografie	62
4.1.3.	Závěrečná purifikace FheCy2 pomocí gelové chromatografie	63
4.2.	Aktivita a inhibice sekretovaných proteas z <i>F. hepatica</i>	64
4.2.1.	Analýza proteolytické aktivity s proteinovými substráty	65
4.2.1.1.	Proteolytická aktivita a inhibice s azokaseinovým substrátem.....	65
4.2.1.2.	Proteolytická aktivita a inhibice se substráty azokolagenem a elastinem congo red.....	66
4.2.2.	Analýza proteolytické aktivity s peptidovými substráty	68
4.2.2.1.	Vyhledání citlivých fluorogenních substrátů.....	68
4.2.2.2.	Klasifikace sekretovaných proteas podle inhibiční specifiky	70
4.2.2.3.	Závislost aktivity hlavních cysteinových proteas na pH	72
4.2.2.4.	Inhibice hlavních cysteinových proteas pomocí FheCy2	73
4.3.	Vizualizace sekretovaných cysteinových proteas pomocí fluorescenční aktivní značky.....	74
5.	Diskuze.....	76
6.	Závěr.....	79
	Seznam použité literatury	81

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. MOTOLICE JATERNÍ (*FASCIOLA HEPATICA*)

1.1.1. ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY MOTOLICE JATERNÍ

Motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) je extracelulární endoparazit patřící do třídy Trematoda (motolice), žijící v játrech hostitele. Rod *Fasciola* obsahuje tři druhy parazitických červů (helmintů), z nichž jsou dva ekonomicky významné, těmito druhy jsou *F. hepatica* a *F. gigantica*, které parazitují na převážně býložravých savcích (ovce, skot, kozy), ale ohrožují i člověka ¹. Třetím druhem z rodu *Fasciola* je druh *F. jacksoni*, vyskytující se pouze na indickém subkontinentu a jehož definitivním hostitelem je slon indický ².



Obr. 1.1: Porovnání velikosti a stavby těla dospělců motolice jaterní (*F. hepatica*) (A) a motolice obrovské (*F. gigantica*) (B). Upraveno dle ³.

Dospělci druhu *F. hepatica* dorůstají 2 až 3 cm, u druhu *F. gigantica* až 7,5 cm. Oba druhy si jsou morfologicky velmi podobné, tělo je zploštělé a má tvar kopinatého listu, jak je patrné z obr. 1.1. Mezi hlavní znaky patří dvě přísavky, ústní a břišní. Ústní přísavka slouží především k získávání živin, oproti tomu břišní přísavka (acetabulum) má za jediný účel pevné přichycení ke stěně žlučovodu, nebo jinému podkladu. Hlavní rozdíly mezi těmito druhy jsou zejména ve velikosti dospělého jedince, v poměru šířky a délky ⁴ a pouze v několika málo dalších detailech (především ve stavbě rozmnožovací soustavy ⁵).

Další fakt poukazující na blízkou příbuznost obou druhů je výskyt kříženců obou druhů, povětšinou označovaných jako *Fasciola sp.* Tyto hybridní formy se vyskytují především v oblastech, kde se vyskytují, nebo dříve vyskytovaly oba druhy současně. Jako příklad lze uvést Egypt ⁶, severní Írán ⁷, Vietnam ³ nebo Japonsko ⁸.

Dospělci *F. hepatica* parazitují v těle hostitele především na stěně žlučovodu, kterou narušují ústní přísavkou, a následně ústy, ukrytými v ústní přísavce, sají krev. Ta motolicím slouží jako hlavní zdroj živin, především hlavní krevní protein hemoglobin. Jako vedlejší zdroj energie využívají motolice epiteliální buňky žlučovodu hostitele ⁹. Nedospělí jedinci se při migraci jaterním parenchymem živí především homogenátem z Kupfferových buněk, leukocytů a erytrocytů, nikoliv krví ¹⁰.

1.1.2. TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ MOTOLICE JATERNÍ

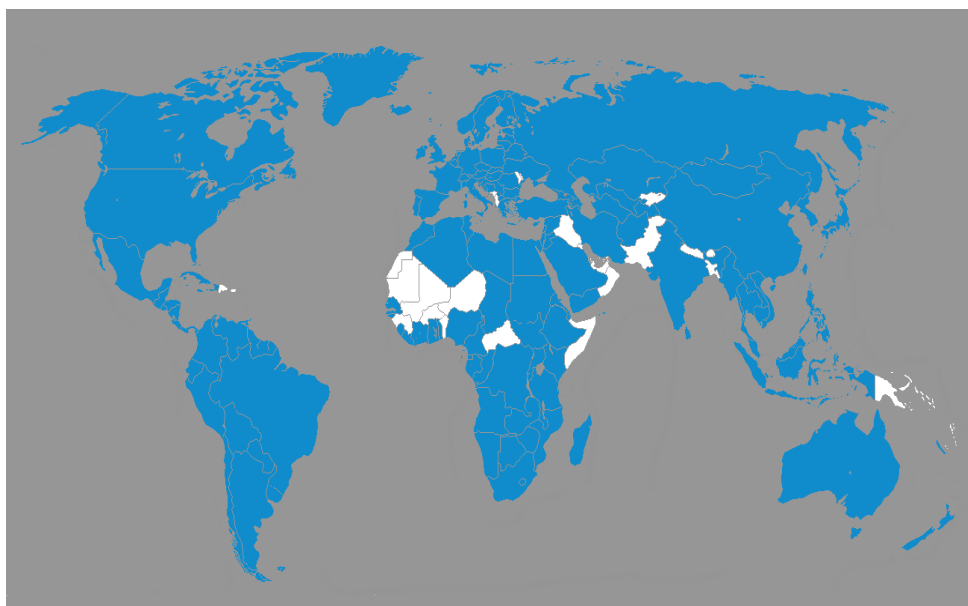
Říše:	Animalia (živočichové)
Kmen:	Platyhelminthes (ploštěnci)
Podkmen:	Neodermata
Třída:	Trematoda (motolice)
Řád:	Echinostomida
Čeleď:	Fasciolidae (motolicovití)
Rod:	<i>Fasciola</i>

Druh: *Fasciola hepatica* (motolice jaterní)
Fasciola gigantica (motolice obrovská)
Fasciola jacksoni

Obr. 1.2: Taxonomické zařazení rodu *Fasciola*. Převzato z ¹¹

1.1.3. VÝSKYT RODU *FASCIOLA*

F. hepatica je původem evropský druh, který se následně rozšířil do celého světa, mimo Antarktidu ¹². Oproti tomu se druh *F. gigantica* vyskytuje pouze v subtropických a tropických oblastech Asie a Afriky ¹³. Celosvětové rozšíření rodu *Fasciola* je znázorněno na obr. 1.3.



Obr. 1.3: Mapa dokumentující rozšíření rodu *Fasciola* na světě. Země se zaznamenanými případy nakažení jsou vyznačeny modrou barvou, bílé jsou země, kde případy nakažení parazity nejsou dokumentovány nebo země, které tyto údaje neposkytují. Upraveno dle ¹⁴.

1.1.4. ŽIVOTNÍ CYKLUS MOTOLICE JATERNÍ

Životní cyklus motolice jaterní je heteroxenní (cyklu se účastní více hostitelů), avšak oproti ostatním motolicím poměrně jednoduchý, jelikož využívá pouze jednoho meziphostitele, jak je znázorněno na obr. 1.5. Meziphostitelem se nazývá takový organismus, ve kterém se parazit vyvíjí jako larvální stadium nebo podstupuje pouze nepohlavní rozmnožování¹.

Rod *Fasciola* využívá jako meziphostitele vodní plže z čeledi plovatkovitých (Lymnaeidae). Původním meziphostitelem je bahnatka malá (*Galba truncatula*), jež se původně vyskytovala pouze v Evropě¹⁵. Při šíření na jiné kontinenty se motolice postupně adaptovaly i na jiné plovatkovité plže, v Austrálii je meziphostitelem *Austropeplea tomentosa*¹⁶ a v Severní Americe *Pseudosuccinea columella*¹⁷ spolu s *Fossaria bulimoides*¹⁸. Do Jižní a Střední Ameriky byl kolonisty zavlečen původní evropský meziphostitel, který zde našel ideální podmínky a značně se rozšířil¹⁹.

Pohlavně dospělé motolice žijí ve žlučovodech svého definitivního hostitele a zde také kladou vajíčka. Ta se spolu se žlučí dostávají do tenkého střeva a dále pokračují s výkaly pryč z těla hostitele. Vajíčko *F. hepatica* má oválný tvar a je vybaveno jedním víčkem nacházejícím se na pólu vajíčka, viz obr. 1.4. Za deště jsou vajíčka z výkalů uvolňována do vody, kterou vajíčko nezbytně potřebuje pro vytvoření larvy zvané miracidium uvnitř vajíčka. Vývoj miracidia je podmíněn několika faktory, nejdůležitější z nich jsou vlhkost, teplota a množství rozpuštěného kyslíku ve vodním prostředí⁹.



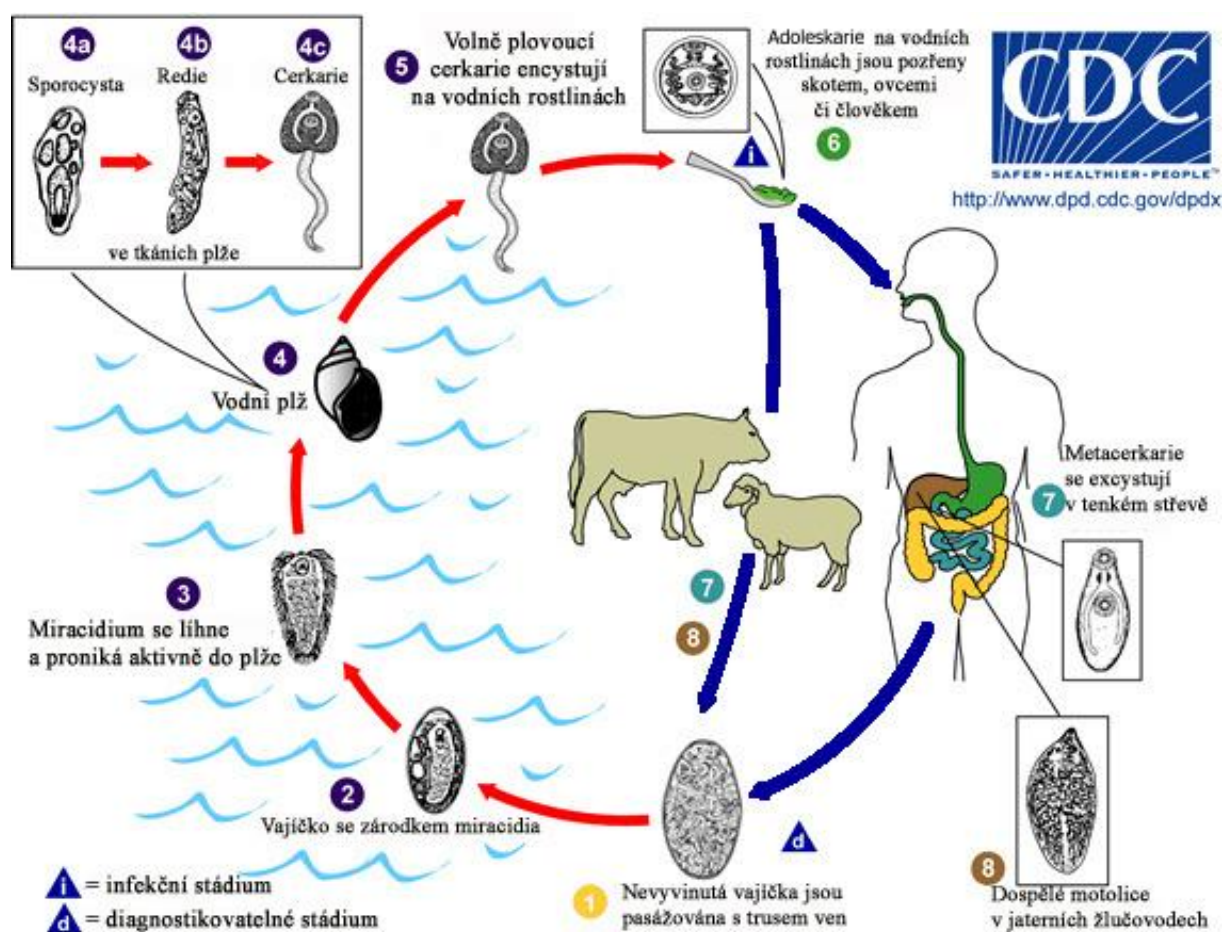
Obr. 1.4: *Vajíčko motolice jaterní.* Z obrázku je patrné charakteristické zbarvení vajíček a umístění víčka na jednom jeho pólu, běžné vajíčko je typicky 140 μm dlouhé a 70 μm široké. Převzato z ²⁰.

Za ideálních podmínek trvá vývoj miracidia 10 dní. Plně vyvinuté miracidium po odklopení víčka opouští vajíčko a aktivně vyhledává vhodného vodního plže. Ke zvýšení šance na nalezení mezihostitele se miracidium orientuje pomocí pozitivní fototaxe, negativní geotaxe a pozitivní chemotaxe, která je zaměřena především na mukopolysacharidy ze slizu mezihostitele. Miracidium nemá vyvinutou trávicí soustavu, a proto nepřijímá žádnou potravu, jeho energetická zásoba pochází pouze z glykogenu uloženého ve vajíčku. Na vyhledání mezihostitele má tedy miracidium velmi omezený čas a to pouze 12 až 24 hod ⁹. Po průniku do těla plže pomocí orgánu zvaného rostrum a díky působení různých proteas miracidium ztrácí obrvení a přeměňuje se na útvar nazývaný sporocysta.

Sporocysta migruje tělem plže a jejím cílem je slinivkojaterní žláza plže, ve které dále roste a vyvíjí se. Ze zárodečných buněk uvnitř sporocysty se po dosažení určité velikosti formuje další stádium zvané redie, které následně opouští tělo sporocysty.

Tato první generace redií se nazývá mateřská. Tito jedinci již disponují trávicí soustavou a živí se především tkáňovým mokem mezihostitele. Další generace, takzvané dceřiné redie, se vyvíjí ze zárodečných buněk uvnitř mateřských redií. Uvnitř této dceřinné generace redií se formuje další stádium nazývané cerkarie.¹⁵

Vyvinuté cercarie opouští tělo redie a poté i tělo plže, který exodus cercarií v drtivé většině případů nepřežije. Doba potřebná k vývinu těchto stádií v těle plže je přibližně 1 až 2 měsíce a je ovlivňována řadou faktorů, ze kterých jsou nejdůležitější teplota, fyziologický stav plže a aktivita jeho imunitního systému ²¹. Cercarie je již morfologicky podobná dospělci, ale její tělo je navíc vybaveno bičíkem, který slouží k pohybu ve vodním prostředí. Cercarie vyhledá vodní rostlinu, odhodí bičík a následně se obalí cystou ¹⁵. Tímto se cercarie přemění na adoleskarii, což je termín označující encystované cercarie na vegetaci ¹.



Obr. 1.5: Vývojový cyklus *F. hepatica*. Červené šipky vyznačují larvální část cyklu využívající pouze nepohlavní rozmnožování probíhající ve vodním plži. Modré šipky značí pohlavní část cyklu, probíhající v definitivních hostitelích (ovce, skot, člověk). Upraveno dle ¹³.

Adoleskarie je infekční a současně poslední larvální stádium ve vývojovém cyklu. Adoleskarie jsou přichyceny na povrch rostliny, nebo se z rostliny mohou uvolnit a pasivně plavat na hladině, takto zůstávají infekční až několik měsíců, jejich metabolismus je mezitím omezen na nejnutnější minimum ¹⁵. Pro dokončení vývojového cyklu musí být adoleskarie zkonsumována definitivním hostitelem.

Po pozření adoleskarií je jejich ochranný obal narušen trávicími enzymy a v tenkém střevu dochází k excystaci nedospělých (juvenilních) motolic, které okamžitě migrují střevní stěnou do břišní dutiny a dále do jater. Někteří juvenilové mohou migrovat i do jiných orgánů, kupříkladu do ledvin ²², plic ²³, oka ²⁴ či míchy ²⁵ a způsobovat ektopické lokalizace parazita, viz obr. 1.6. Tito jedinci ve výše zmíněných necílových orgánech nemohou pohlavně dospět, ale jsou schopni zde dlouhodobě přežívat a způsobovat nejružnější zdravotní komplikace.



Obr. 1.6: Ektopická lokalizace juvenilního motolice jaterní v oku šestiletého chlapce. Chlapec byl na oko slepý a trpěl edémy obličejové části hlavy. Převzato z ²⁶.

Nedospělé motolice migrující skrze jaterní parenchym po několik týdnů a neustále rostou. Po dosažení určité velikosti se přesouvají do žlučovýchodů, kde ukončí svoji pouť tělem hostitele. Ve žlučovodu motolice pohlavně dospějí a začínají produkovat vajíčka, kterých motolice průměrně klade až 25 000 denně. Od průniku adoleskarie do těla hostitele po nalezení prvních vajíček ve výkalech uběhne zpravidla 8 až 10 týdnů. Dospělci se ve žlučovodu živí krví a žlučí a mohou ve žlučovodu přežívat a rozmnožovat se velmi dlouhou dobu, i řadu let ⁹.

1.2. Fasciolóza

1.2.1. OBECNÝ POPIS FASCIOLÓZY

Motolice *F. hepatica* a *F. gigantica* způsobují u svých definitivních hostitelů onemocnění fasciolóza. V minulosti, před objevením parazitické příčiny nemoci, byla nazývána jaterní hnilobou ⁹. Fasciolóza má především velký ekonomický dopad na živočišnou výrobu ^{27, 28}. Podle nejstřízlivějších odhadů způsobuje ztráty za zhruba 3,5 miliard dolarů ročně. Toto onemocnění je u hospodářských zvířat rozšířeno celosvětově a jedná se o vůbec nejrozšířenější chorobu způsobenou parazitem ²⁹.

V posledních letech dochází ke značnému nárůstu prevalence fasciolózy, za viníka bývají označovány klimatické změny v podnebí, které umožňují přežít mezihostitelům i tam kde dříve nebyli schopni dlouhodobě přežít (vyšší nadmořské výšky apod.). V současné době je onemocnění označováno jako celosvětově nejvýznamnější zoonóza (což je parazitární onemocnění přenosné mezi lidmi a zvířaty) vázaná na rostliny ^{19, 30}.

Jiná je situace u člověka, zde je nakaženo cca 2,4 milionu lidí, a dalších 180 milionů žije s rizikem nákazy především v rozvojových zemích Jižní Ameriky, Afriky a Asie. Mezi vyspělé země s nadprůměrným počtem nakažených patří Španělsko, Francie, Portugalsko a země bývalého Sovětského svazu ¹².

Jedinou oblastí s vysokou prevalencí fasciolózy je náhorní plošina Altiplano v Jižní Americe. Zde je díky zvyku požívání pokrmů připravovaných ze syrových vodních rostlin a současnému zavlečení bahnatky malé prevalence u dospělých lidí 68%, u dětí do patnácti let až 100% ^{31, 32}.

1.2.2. KLINICKÉ PŘÍZNAKY FASCIOLÓZY

Klinické příznaky závisí především na délce trvání, intenzitě infekce a požitím množství infekčních adoleskarií. K dalším velmi důležitým faktorům patří stav imunitního systému a celkový zdravotní stav hostitele.

Průběh fasciolózy lze rozdělit do 3 fází, a to podle doby uplynuté od nakažení infekčními stádii. Těmito fázemi jsou postupně fáze inkubační, akutní a chronická.

Jako inkubační fáze je označována doba od požití adoleskarie po objevení prvních příznaků, může se pohybovat od několika dnů až po tři měsíce ³³.

V akutní fázi juvenilní motolice migrují z tenkého střeva jaterním parenchymem do žlučového. Výsledkem je mechanické poškození stěny tenkého střeva, jaterního parenchymu a pobřišnice, které může být provázeno alergickými reakcemi. Nejdůležitějšími symptomy této fáze jsou velmi vysoké horečky (40-42 °C), bolesti břicha, kopřivka a různé žaludeční obtíže ³³.

Z akutní fáze onemocnění plynule přechází do fáze chronické a to v řádu několika měsíců od první infekce adoleskariemi. Dospělé motolice se z jaterního parenchymu přesouvají do žlučových, ve kterých se hromadí. Přitom dochází k zbytnění žlučových, zánětu a ucpávání, viz obr. 1.7 na str. 21. Tyto komplikace se projevují nevolnostmi, bolestmi v nadbřišku, žloutenkou a průjmy. Mezi další zdravotní obtíže patří tvorba žlučnickových kamenů, časté žlučnickové záchvaty, postupná kalcifikace žlučových, patologické zvětšení jater nebo sleziny, ascites (hromadění vody v břišní dutině), anémie a žloutenka ³³. Mechanické poškození, dlouho trvající zánětlivé reakce a účinky exkreční-sekrečních produktů vyvolávají u mnoha příbuzných druhů motolic žijících v játrech nádorové bujení, lze proto předpokládat, že podobné komplikace budou způsobovat i dospělci rodu *Fasciola* ³⁴.

U chovných zvířat je největším problémem jejich špatné prospívání a s ním spojená ekonomická ztráta. Průběh fasciolózy je obecně velmi podobný jako u člověka ³⁵.



Obr. 1.7: *Hypertrofie žlučových kanálků v játrech kozy způsobené dospělci motolice jaterní. Převzato z ³⁶.*

1.2.3. *DIAGNOSTIKA, PREVENCE A LÉČBA FASCIOLÓZY*

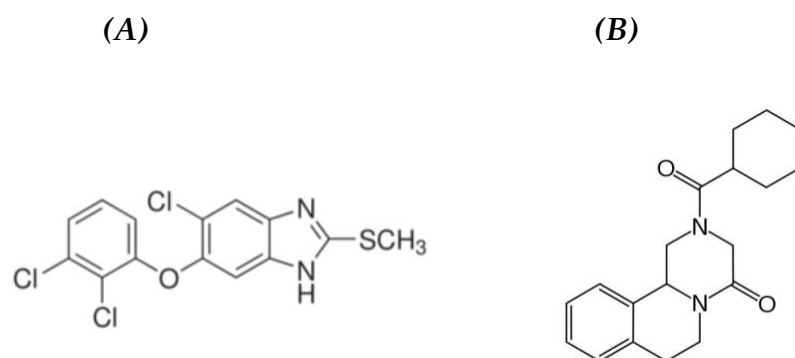
Historicky nejstarší, ale i v dnešní době nejčastěji využívanou metodou pro diagnostiku fasciolózy, je takzvané koprologické vyšetření, při kterém se ve stolici hledají vajíčka motolic ^{37, 38}. V současné době jsou díky rozvoji imunodetekčních technik hlavními metodami používanými k diagnostice protilátek v séru nebo k detekci parazitických antigenů ELISA a Western Blot ³⁹. V několika studiích se vajíčka druhů *F. hepatica* a *F. gigantica* identifikovala díky amplifikaci DNA pomocí PCR ⁴⁰.

Jako prevence proti nakažení fasciolózou se doporučuje především osvěta obyvatelstva a požívání pouze tepelně upravených rostlin. V případech, kdy to není možné, preventivní podávání anthelmintik ⁴¹.

Léků používaných proti fasciolóze, nazývaných fasciolicidy, je velké množství. Dají se rozdělit do pěti velkých skupin, kterými jsou halogenované fenoly (bithionol), salicylanilidy (closantel), benzimidazoly (triclabenzol), sulfonamidy (clorsulon) a fenoxialkany (diamfenetid) ⁴².

Pro léčbu lidí se používá především triclabendazol, jeho hlavní výhodou je vysoká účinnost a to proti dospělým motolicím i proti juvenilním stádiím ⁴³. Jeho struktura je znázorněna na obr. 1.8. Bohužel, díky používání tohoto jediného léku jako monoterapie, se již objevily resistance. První příklad resistance *F. hepatica* na triclabendazol byl popsán v roce 1995 na několika farmách v Austrálii ⁴⁴. Od této doby, a to zejména v posledních letech, se počet hlášení o rezistencích meziročně prudce zvyšuje ⁴⁵.

F. hepatica a *F. gigantica* jsou jediné dva druhy z celé třídy motolic přirozeně odolné proti podávání praziquantelu, což je běžně používané a proti ostatním motolicím vysoce účinné anthelmintikum ^{46, 47}.



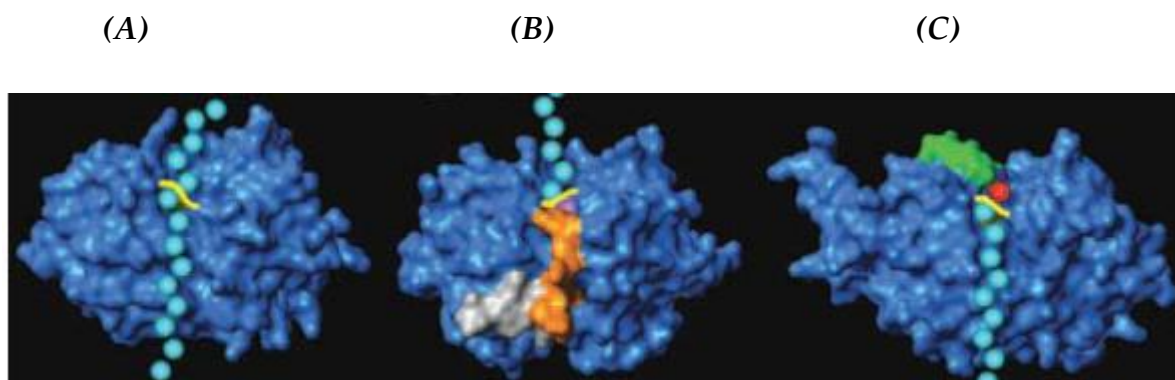
Obr. 1.8: Strukturní vzorce antihelmintik. (A) triclabendazol, (B) praziquantel.
Upraveno dle ^{48, 49}.

1.3. PROTEASY

1.3.1. KLASIFIKACE PROTEAS

Proteasy, označované také jako proteinasy či peptidasy, jsou enzymy, katalyzující štěpení peptidové vazby. Peptidová vazba je termodynamicky velice stálá, chemická degradace vyžaduje 6 M HCl a 100 °C po dobu 24 hod ⁵⁰. Proteasy štěpí při 37 °C a fyziologickém pH rychlostí až 100 peptidových vazeb za sekundu. Tato skupina enzymů ke své správné funkci vyžaduje přítomnost molekul vody v aktivním místě enzymu a patří tedy mezi hydrolasy.

Proteasy lze rozdělit do dvou velmi širokých skupin, a to podle umístění štěpené peptidové vazby v aminokyselinovém řetězci proteinu. Proteasy odštěpující aminokyseliny z konce polypeptidového řetězce se nazývají exopeptidasy, ty se dále rozdělují na karboxypeptidasy, štěpící od C-konce, a aminopeptidasy, štěpící od N-konce polypeptidického řetězce. Druhá skupina se nazývá endopeptidasy a štěpí peptidovou vazbu uvnitř aminokyselinového řetězce ⁵¹. Pro bližší představu jsou oba druhy proteas znázorněny na obr. 1.9.



Obr. 1.9: Příklad štěpení substrátu různými typy proteas. (A) endopeptidasa katepsin L, **(B)** aminopeptidasa katepsin H, **(C)** karboxypeptidasa katepsin X. Světle modrými kuličkami je znázorněn štěpený substrát, žlutě je označena štěpená peptidová vazba. Odštěpovaná N-koncová aminokyselina je znázorněna fialovou kuličkou, C-koncová aminokyselina červenou. Šedě, oranžově a zeleně jsou označeny

strukturní domény proteas zodpovědné za exopeptidasovou aktivitu. Upraveno dle 52.

Proteasy a proteinové inhibitory proteas jsou rozdělovány podle jejich sekvenční a strukturní příbuznosti do klanů a rodin. Rodina je skupina proteas, ve které každý člen vykazuje evoluční příbuznost k minimálně jednomu dalšímu členu rodiny^{53, 54}. Proteasa tedy zpravidla vykazuje shodné aminokyselinové sekvence se členy stejné rodiny a to především v sekvenci zodpovědné za katalytickou aktivitu. Termínem klan se označuje skupina rodin ve vzájemném evolučním vztahu, které postrádají statisticky významné shody v aminokyselinové sekvenci, ale s vysokou pravděpodobností divergovala z jednoho evolučního předka^{53, 54}. Sjednocujícím znakem bývá pořadí katalytických míst v sekvenci, terciární struktura, substrátová specifita či citlivost k inhibitorům. Databáze proteas a jejich proteinových inhibitorů rozřazených podle výše uvedených evolučních hledisek se nazývá MEROPS a obsahuje data o více než 2 000 proteasách a 400 inhibitorech⁵⁵.

Podle hlavních katalytických aminokyselinových zbytků v aktivním místě enzymu se dělí proteasy do šesti velkých skupin, na proteasy: serinové (s funkční -OH skupinou serinu), cysteinové (s funkční -SH skupinou cysteinu), aspartátové (s funkční -COOH skupinou kyseliny asparagové), treoninové (s funkční -OH skupinou threoninu), glutamátové (s funkční -COOH skupinou kyseliny glutamátové) a metaloproteasy (kde je funkční skupinou iont kovu)⁵⁶.

Serinové proteasy

Serinové proteasy jsou velká skupina proteas, v databázi MEROPS se dělí do 12 klanů a zhruba 50 rodin, což je takřka třetina všech známých proteolytických enzymů. Patří mezi nejdůkladněji prozkoumané proteolytické enzymy. Typickým znakem je katalytická vazebná štěrbina na povrchu enzymu tvořící aktivní centrum a přítomnost, pro serinové proteasy krucální, katalytické triády aminokyselin Asp - His - Ser. Tato triáda posiluje nukleofilitu hydroxylové skupiny serinu pomocí tzv. nábojové štafety, kterou tvoří již zmíněná hydroxylová skupina serinu, imidazolová skupina histidinu a karboxylová skupina kyseliny asparagové. Intermediátem při

rozpadu peptidové vazby je substrát kovalentně vázaný na hydroxylovou skupinu serinu ⁵⁷. Nejznámějšími zástupci z této skupiny jsou trypsin, chymotrypsin, plasmin, trombin a elastasa.

Aspartátové proteasy

Tato skupina je tvořena pouze endopeptidasami, rozdělenými do 5 klanů a 16 rodin. Jejich pH optimum leží v kyselé oblasti a mezi nejvýznamnější zástupce patří pepsin, chymosin, renin, katepsin D a proteasa viru HIV. Aktivní místo enzymu tvoří dva zbytky asparagové kyseliny. Jeden karboxyl je donorem protonu, zatímco druhý napadá molekulu vody jako nukleofil. Z molekuly vody se stává hydroxylový aniont, který následně napadá peptidovou vazbu substrátu, tím pádem se při štěpení peptidové vazby netvoří kovalentní intermediát ⁵⁸. Aspartátové proteasy využívají čistě acidobazický mechanismus katalýzy.

Treoninové proteasy

Skupina relativně málo prozkoumaných proteas. Je tvořena pouze 4 rodinami. Prvním objeveným enzymem využívajícím v aktivním místě N-koncový nukleofilní threonin byl eukaryotní proteasom, popsáný v roce 1995 ^{59, 60}. Threoninové proteasy, podobně jako proteasy serinové, vytvářejí se substrátem kovalentní intermediáty.

Glutamátové proteasy

Tato skupina proteas je tvořena dvěma klany a dvěma rodinami. První glutamátová proteasa byla objevena v roce 2004, do té doby byly tyto enzymy označovány jako aspartátové proteasy necitlivé k pepstatinu ⁶¹. Aktivní místo je tvořeno aminokyselinami glutaminem a kyselinou glutamovou. Mechanismus štěpení peptidové vazby je velmi podobný mechanismu aspartátových proteas.

Metaloproteasy

Početná skupina proteas, tvořená 16 klany a zhruba 60 rodinami, jsou evolučně velmi staré enzymy, které pro aktivaci vody využívají jeden nebo více atomů kovu. Tímto kovem bývá nejčastěji zinek, v některých případech je v aktivním

centru přítomný kobalt. Atom kovu je v proteinu vázán interakcí se třemi aminokyselinami, nejběžnějším motivem je His – Glu – X – X – His, kde X je jakákoliv aminokyselina ⁶². Aktivita metaloproteas je inhibována kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA), která chelatuje atom kovu z aktivního místa enzymu ⁶³. Mechanismus štěpení peptidové vazby je podobný mechanismu glutamátových a aspartátových proteas, tedy netvoří kovalentní intermediát s molekulou substrátu, peptidová vazba je štěpena aktivovanou molekulou vody ⁶². Jako příklad metaloproteasy lze uvést kupříkladu matrixové metalopeptidasy, kolagenasu nebo lidskou karboxypeptidasu A1.

Cysteinové proteasy

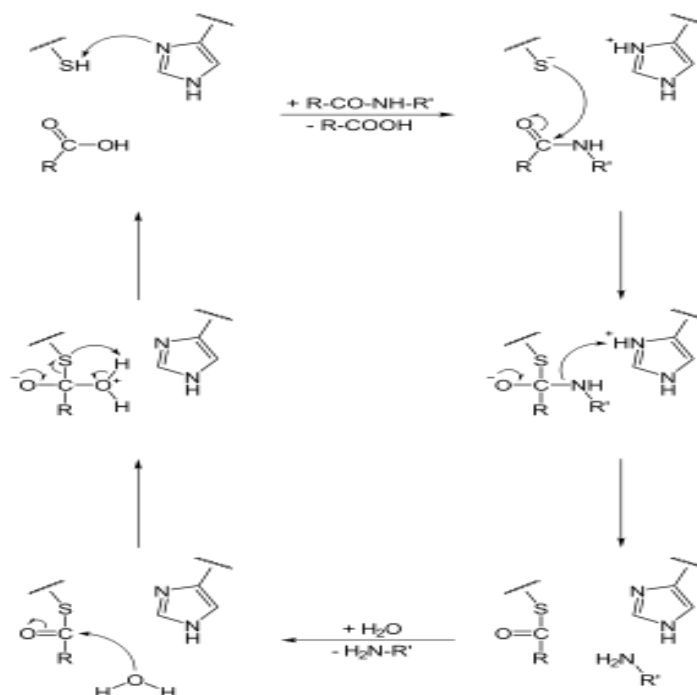
Cysteinové proteasy jsou obsáhlou skupinou proteas, využívanou takřka všemi organismy, a to od virů až po živočichy ⁶⁴. Rozdělují se do 9 klanů a ty do zhruba 60 rodin. Jejich pH optimum bývá zpravidla v mírně kyselé oblasti. Nejdůležitějšími klany jsou klany CA a CD ⁶⁵.

Klan CA zahrnuje cysteinové proteasy papainového typu, mezi jeho nejvýznamnější zástupce patří papain, katepsiny L a B a kalpainy. Do klanu CD patří například legumain či kaspasy. Většina cysteinových proteas má především endopeptidasovou aktivitu, pouze malá část rodiny C1 z klanu CA vykazuje i exopeptidasovou aktivitu ⁶⁶. Tyto enzymy jsou tvořeny párem relativně stejně velkých globulárních domén, mezi kterými se nachází štěrba aktivního centra enzymu.

1.3.2. Katalytický mechanismus cysteinových proteas

Cysteinové proteasy štěpí peptidovou vazbu podobným mechanismem jako proteasy serinové, jen s tím rozdílem, že nukleofilem působící v katalytickém místě enzymu je místo hydroxylu serinu thiolová skupina cysteinu ⁶⁷. Tento thiolový nukleofil se váže na karbonylový uhlík ze štěpené peptidové vazby, jak ukazuje obr. 1.10 na str. 27.

Histidin aktivního centra interaguje s thiolovou skupinou cysteinu, a to tak, že zvyšuje nukleofilitu thiolové skupiny. Histidin přijímá proton a dává tak vzniknout imidazolium – thiolátovému systému. Tento systém se nazývá katalytická dyáda a její přítomnost je typická pro všechny cysteinové proteasy ⁶⁷. Pořadí histidinu a cysteinu v aminokyselinové sekvenci enzymu se liší u jednotlivých rodin.



Obr. 1.10: Předpokládaný reakční mechanismus cysteinových proteas. Prvním krokem je deprotonace thiolové skupiny cysteinu působením imidazolové skupiny histidinu. Druhým krokem je nukleofilní útok thiolátového anionu na karbonylový uhlík substrátu a vytvoření tetraedrického thioesterového intermediátu (uhlíkový atom štěpené vazby je vázán kovalentně na enzym). Ve třetím kroku dochází k obnově deprotonované formy histidinu, donací protonu na nově vznikající koncovou aminokyselinu a uvolnění prvního produktu štěpení. Druhý produkt je uvolněn nukleofilním atakem vody na thioesterově vázaný karbonylový uhlík, přičemž je zformována koncová karboxylová skupina druhého produktu a současně dochází k regeneraci thiolové skupiny cysteinu. Převzato z ⁶⁸.

Tetraedrický thioesterový intermediát obsahuje oxyanion, který je stabilizován zbytkem aminokyseliny glutaminu v elektrofilním centru nazývaném oxyaniontová

díra v blízkosti aktivního místa. Tato stabilizace, jak bylo dokázáno, je pro funkci enzymu postradatelná (na rozdíl od serinových proteas), ale její stabilizační efekt znatelně zvyšuje proteolytickou aktivitu enzymu ⁶⁹.

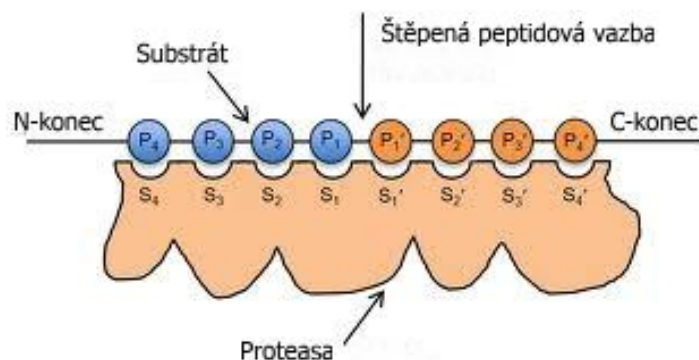
1.3.3. Substrátová specifita cysteinových proteas

Navázání substrátu do aktivního místa enzymu je ovlivňováno několika důležitými faktory. Prvním je chemismus aktivního místa, tedy chemické prostředí tvořené postranními zbytky zde přítomných aminokyselin. Dalšími faktory jsou chemické vlastnosti substrátu, jeho velikost, rozložení nábojů, polarita či hydrofobicita ⁷⁰. Velmi důležitou roli hraje i samotná orientace štěpené peptidové vazby v prostoru aktivního místa enzymu.

Před vlastní hydrolýzou peptidové vazby je nutné substrát správně fixovat v aktivním centru a to pomocí interakcí mezi zbytky aminokyselin v okolí katalytického centra enzymu a sledu několika aminokyselin v aminokyselinové sekvenci substrátu před a za štěpenou vazbou. Nejdůležitější jsou zpravidla nejbližší aminokyselinové zbytky místa štěpení ⁷⁰.

Aminokyselinové zbytky v molekule štěpeného substrátu jsou podle Schechtera a Bergera ⁷⁰ označovány od štěpené peptidové vazby směrem k N-konci (poly)peptidu postupně P1, P2, P3,..., Pn. Směrem k C-konci (poly)peptidu jsou aminokyselinové zbytky popisovány analogicky jako P1', P2', P3',..., Pn'. Aminokyselinové zbytky štěpeného substrátu interagují se zbytky kolem katalytického centra proteasy, která tvoří vazebná podmísta, označovaná S_n, kde index má stejnou hodnotu jako jemu odpovídající P místo substrátu. Pro lepší představu viz obr. 1.11.

Obecně lze říci, že specifita proteasy je úměrná délce rozpoznávané sekvence v okolí štěpené vazby. Takto lze výrazně zvýšit specifitu až na jediný substrát v komplexním proteomu. Jako příklad lze uvést proteasu renin, která štěpí angiotensinogen na angiotensin I a žádný jiný přirozený lidský substrát není znám ⁷¹.



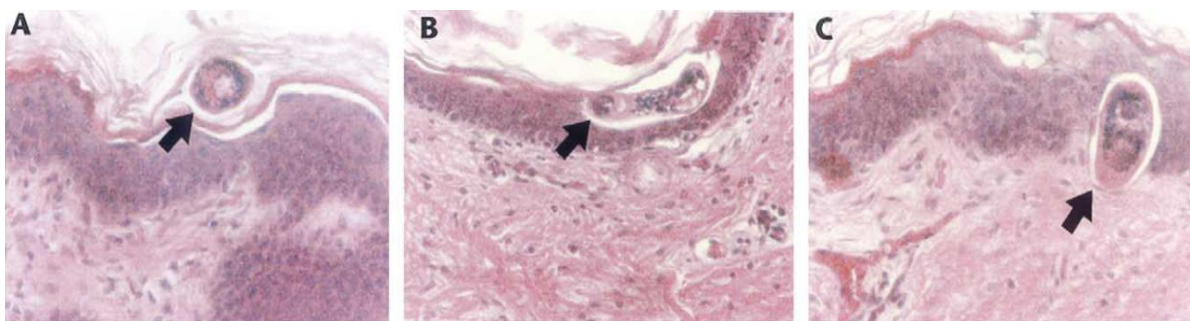
Obr. 1.11: Schematické znázornění vazby substrátu na specifická vazebná místa proteasy. Aminokyseliny v okolí štěpené vazby jsou popsány dle Schechtera a Bergera. Upraveno dle ⁵².

1.3.4. BIOLOGICKÉ FUNKCE PROTEAS

Díky své jedinečné schopnosti štěpit peptidové vazby plní proteasy v organismu nejrůznější funkce. Obecně lze funkce proteas rozdělit na digestivní a regulační. Mezi digestivní procesy zprostředkované proteasami patří lysosomální degradace proteinů a trávení potravy, tedy postupné štěpení proteinů až na jednotlivé aminokyseliny. Proteasy se podílejí především na regulaci dějů jako je kontrola buněčného cyklu, apoptóza, aktivace prekurzorů, regulace aktivity jiných proteas, buněčná signalizace, přestavba tkání a kostí a koagulace krve. Řada biologických dějů je regulována proteasami ve více stupních, lze tak dosáhnout lepší modulace kaskády. Digestivní i regulační pochody probíhají pouze na určitém místě a v určitém časovém úseku, jejich působení mimo tyto podmínky je pro organismus nebezpečné a proto je činnost proteas přísně regulována. Jako příklad onemocnění způsobeného špatnou regulací proteas, či štěpením nefyziologického proteinového substrátu, lze uvést degradaci extracelulární matrix při rozvoji nádorového onemocnění ⁷² nebo štěpení amyloidového proteinu membránovou aspartátovou proteasou při Alzheimerově chorobě ⁷³.

Parazitické organismy, dlouhodobě přežívající v těle svého hostitele, využívají proteas pro velmi specifické děje jako je migrace skrze tkáň hostitele, nebo při překonávání jeho imunitního systému ^{74, 75}.

Motolice rodu *Fasciola* vstupují do těla hostitele s potravou a do cílových orgánů se dostávají z tenkého střeva. U motolic rodu *Schistosoma* se larvální stádia nedostávají do hostitele s potravou, ale aktivně vyhledávají hostitele a pronikají do jeho těla kůží (obr. 1.12) a tak způsobí nepříjemnou vyrážku známou jako cercáriová dermatidita ^{76, 77}. Předpokládá se, že migrace parazita tkání je zprostředkována uvolněním proteolytických enzymů, které jsou schopné tkáň degradovat. Již dříve byly identifikovány velmi účinné serinové a cysteiné proteasy a metaloproteasy v sekrečních produktech larválních hlístic ⁷⁸. Parazité nemigrují tělem pouze z tenkého střeva do cílového orgánu jako je tomu u rodu *Fasciola*, ale kupříkladu řád Trichocephalida využívá proteasy i při pronikání do tkáně svalů, kde se zapouzdří a čeká na pozření definitivním hostitelem ⁷⁹. Využití proteas pro migraci parazitů tkáněmi hostitele je podobné procesům, které využívají nádorové buňky pro degradaci okolní tkáně při růstu nádoru a při zakládání metastáz ⁸⁰.



Obr. 1.12: Histologická analýza migrace schistosomuly (larválního stadia) druhu *Schistosoma mansoni* skrze lidskou kůži v orgánových kulturách. (A) Šipkou je označena larva 4 hod po vystavení pokožce, zde pronikající nejsvrchnějšími vrstvami epidermis. (B) Larva po 8 hod již penetrovala hlouběji a leží horizontálně na bazální membráně. (C) Situace po 12 hod, kdy již larva migruje srze bazální membránu. Upraveno dle ⁷⁶.

Parazité si vyvinuli několik různých mechanismů, které jim pomáhají překonat imunitní systém hostitele. Proteasy se účastní především modulace různých složek imunity hostitele. Příkladem jsou cysteinové proteasy parazitů, schopné štěpit imunoglobuliny in vitro (ačkoli přímé důkazy z in vivo experimentu zatím chybí)⁷⁵. Štěpení protilátek in vitro bylo prokázáno u několika parazitů, jako je *Trichomonada vaginalis*⁷⁸, *Trypanosoma cruzi*⁸¹, *F. hepatica*⁸², *F. gigantica*⁸³ a *Spirometra mansonii*⁷⁵.

Potlačení funkce imunitního systému parazitem vystavuje hostitele zvýšenému riziku nákazy jinými parazity, i bakteriemi či viry. U pacientů nakažených *T. vaginalis* je riziko přenosu viru HIV až pětinašobně vyšší než u nenakažených pacientů⁸⁴.

1.3.5. TRÁVICÍ PROTEASY Z PARAZITŮ SAJÍCÍCH KREV

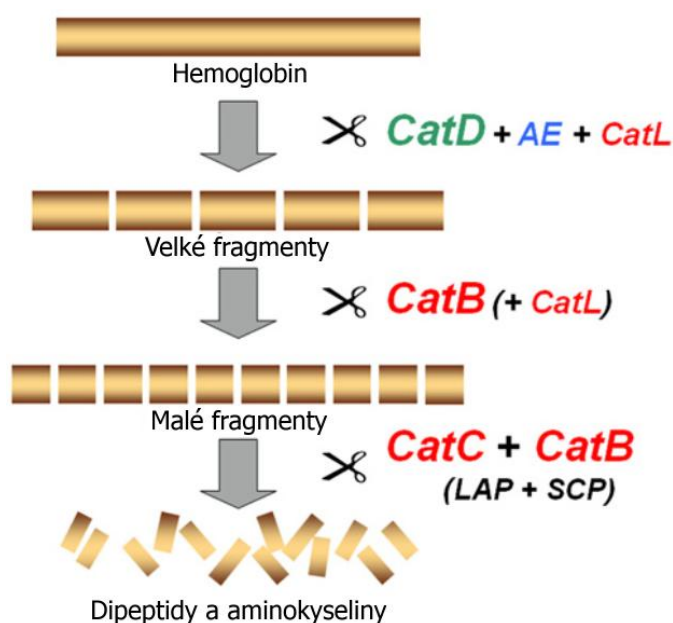
Motolice jaterní získává, podobně jako ostatní parazité živící se krví, živiny potřebné pro růst, vývoj a reprodukci z krve svého hostitele. Nejvíce zastoupeným proteinem v krvi a tedy i hlavním zdrojem živin těchto živočichů je hemoglobin. Pro degradaci hemoglobinu parazité sekretují do své trávicí soustavy nebo do svého hostitele široké spektrum trávicích proteas. Hemoglobin je postupně těmito proteasami degradován z proteinového tetrameru až na krátké peptidové fragmenty a aminokyseliny, které metabolismus parazita může dále využít⁸⁵.

Parazité živící se krví vyvinuli v průběhu evoluce dva odlišné mechanismy trávení hemoglobinu. První probíhá v kyselém prostředí, je závislý na cysteinových a aspartátových proteasach a jeho příklad je na obr. 1.13. Takto tráví hemoglobin například klíšťa^{86,87}, motolice⁸⁸ či plasmodia⁸⁹. Druhý mechanismus je založen na serinových proteasach a probíhá při neutrálním pH. Tento typ degradace hemoglobinu využívají komáři⁹⁰, blechy a další hematofágní hmyz⁹¹.

Nezávisle na tom, jaký mechanismus parazité využívají pro trávení hemoglobinu, je lze rozdělit i podle lokalizace procesu degradace hemoglobinu na

druhy s intracelulární hemoglobinolysou (klíšťata ⁹², zimničky ⁹³) a extracelulární hemoglobinolysou probíhající v lumenu střeva (motolice jaterní ⁹⁴, měchovec lidský ⁹⁵).

Blokování trávicích enzymů má, díky jejich kritickému významu pro metabolismus, silně supresní účinky na životaschopnost a reprodukci parazitů. Tato skutečnost tedy předurčuje trávicí proteasy jako významné cíle terapeutického zásahu proti různým hematofágním parazitům ⁸⁶. Díky tomu se v posledním desetiletí intenzivně studují různé parazitické proteasy a to především ty, u kterých se očekává důležitá role v trávení hemoglobinu. Tento výzkum vedl k identifikaci hemoglobinolytické kaskády například u klíšťete *Ixodes ricinus* ⁹² nebo u zimničky *Plasmodium falciparum* ^{93, 96}



Obr. 1.13: Trávicí kaskáda hemoglobinu u klíšťete obecného (*Ixodes ricinus*). Molekula hemoglobinu je nejdříve štěpena katepsinem D (CatD), legumainem (AE) a katepsinem L (CatL) na velké fragmenty, které jsou dále degradovány endopeptidasovou aktivitou katepsinu B (CatB) a katepsinu L. Vznikají malé peptidové fragmenty, které jsou postupně odbourány na dipeptidy a volné aminokyseliny působením exopeptidas: dipeptidasovou aktivitou katepsinu C (CatC) a katepsinu B (CatB) a mono-peptidasovou aktivitou serinové

karboxypeptidasy (SCP) a leucinové aminopeptidasy (LAP). Červenou barvou jsou označeny cysteinové proteasy z klanu CA, zelenou aspartátové proteasy z klanu AA, modrou cysteinové proteasy z klanu CD a černou jsou označeny metaloproteasy a serinové proteasy. Upraveno dle ⁹².

1.3.6. *PROTEASY Z MOTOLIC RODU FASCIOLA*

V současné době (5. 5. 2013) databáze MEROPS eviduje u druhu *F. hepatica* celkem 8 různých proteolytických enzymů. Z nich je 5 cysteinových proteas z klanu CA a C1 (rodina papainu), mezi které patří např. katepsiny L1 až L3 a fascipain B (proteasa typu katepsinu B), další cysteinovou proteasou je legumain z klanu CD ⁵⁵. Zbývajících identifikovaných proteasami je katepsin D, patří mezi aspartátové proteasy z klanu AA, a leucinová aminopeptidasa, což je metalopeptidasa z klanu MF ⁹⁷. Všechny tyto enzymy byly identifikovány jak u druhu *F. hepatica*, tak u druhu *F. gigantica*.

Tato diplomová práce se soustřeďuje na proteasy přítomné v tzv. exkreční-sekrečních produktech, které jsou uvolňované parazitickou motolicí v těle hostitele a jsou považovány za perspektivní antigeny pro vývoj nových antiparazitárních vakcín.

1.3.7. *EXKREČNÍ-sekreční produkty motolice jaterní*

Exkreční-sekreční produkty (ESP) jsou směsí proteinů, které jsou buď sekretovány nebo exkretovány do těla hostitele. ESP parazitických organismů hrají důležitou roli v interakci hostitele a parazita, při migraci parazita hostitelskou tkání ⁹⁸, při trávení potravy ⁹⁹, ale jsou důležité i pro přežití samotného parazitického organismu ve vnitřním prostředí hostitele a překonání jeho imunitního systému ^{79, 101, 101}.

ESP jsou tvořeny v různých tkáních parazita. Trávicí soustava *F. hepatica* je stejně jako u ostatních motolic slepě zakončená, takže velká část ESP je sekretována epitelem trávicí soustavy a do těla hostitele se dostává vyvrhováním s nestrávenými zbytky skrze ústa ¹. Za další tkáň, podílející se na produkci ESP, je považován celý tegument (povrchová vrstva pokožky) motolice ¹⁰¹.

Proteiny obsažené v ESP ovlivňují imunitní systém různými mechanismy, mezi které patří imunosupresivní a modulační účinky na lymfocyty nebo neutrofilní granulocyty, antioxidační účinky nebo štěpení molekul protilátek ^{102, 103}. Dalším mechanismem u *F. hepatica* je obměna a uvolňování vnějšího, silně imunogenního glykokalyxu (ochranný plášť parazita, tvořený především glykoproteiny a oligosacharidy) do prostředí.

ESP sekrety motolic rodu *Fasciola* obsahují zhruba 60 proteinů, mezi které patří např. protein vázající mastné kyseliny FABP, superoxiddismutasa, thioredoxin a katepsin L.

1.4. INHIBITORY PROTEAS

Inhibitory proteas jsou látky, které tlumí nebo zcela blokují aktivitu proteolytických enzymů. Jsou to látky s velkým biologickým dopadem. Obecně mají funkci buď obrannou, kdy inhibují činnost proteas v případech, ve kterých by její aktivita mohla vést k poškození organismu, nebo funkci regulační. Regulace proteolytických procesů hraje ve všech životních formách velmi důležitou roli.

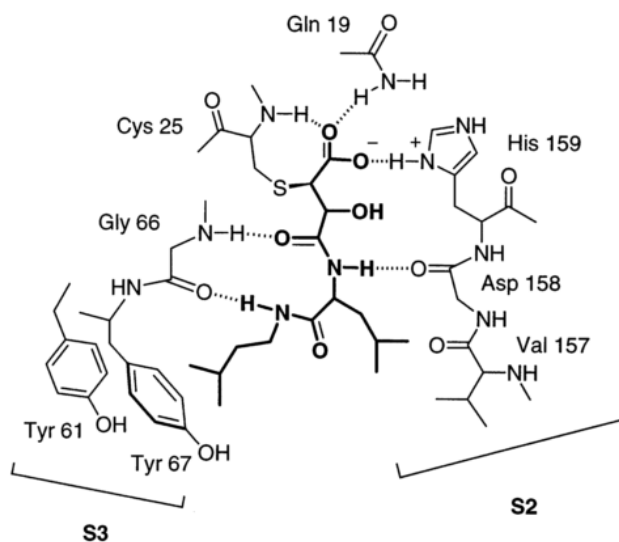
Aktivita proteas je modulována různými způsoby, mezi které například patří pH optimum proteas, dostupnost molekul vody v prostředí (důležité především u membránových proteas), syntéza ve formě neaktivního preproproteinu nebo inhibice aktivity pomocí specifických inhibitorů ¹⁰⁴. Na důležitou úlohu inhibitorů proteas poukazuje i fakt, že ze zhruba 200 proteinů přítomných v lidském krevním séru jich 20 náleží mezi proteasové inhibitory.

1.4.1. KLASIFIKACE INHIBITORŮ PROTEAS

Inhibitory proteas lze dělit podle mnoha kritérií. Podle molekulové hmotnosti je lze rozdělit na nízkomolekulární inhibitory (menší než 1 kDa) a proteinové inhibitory (delší aminokyselinové řetězce). Proteinové inhibitory proteas se nacházejí u všech živých organismů a patří mezi velmi rozšířené proteiny.

Nízkomolekulární inhibitory blokuji aktivní centrum cysteinových proteas byly identifikovány v mnoha přírodních zdrojích, ze kterých byly následně izolovány. Zástupcem této skupiny inhibitorů je kupříkladu peptidyl aldehyd leupeptin (Ac-Leu-Leu-Arg-H) izolovaný z bakterií rodu *Streptomyces*, který inhibuje cysteinové, serinové a threoninové proteasy ¹⁰⁵.

Dalším příkladem je peptidyl epoxysukcinát nazývaný E-64 (trans-epoxysukcinyl-L-leucylamido-4-guanidinobutan). Tento inhibitor byl izolován z plísni rodu *Aspergillus japonicus*. Inhibitor E-64 nereverzibilně inhibuje cysteinové (obr. 1.14) a některé serinové proteasy ¹⁰⁶.



Obr. 1.14: Schematické znázornění vazby inhibitoru E-64 do aktivních míst S2 a S3 proteasy papainu. Struktura inhibitoru E-64 je vyznačena tučně. Upraveno dle ¹⁰⁷.

Z přírodních inhibitorů se vychází při vývoji nových syntetických inhibitorů. Tyto inhibitory podstupují různé modifikace, například derivatizace aminokyselin, změna aminokyselinové sekvence nebo prodloužení či zkrácení peptidového řetězce. Takto připravené látky jsou významné zejména při charakterizaci vazebných míst v okolí aktivního centra enzymu a za ideálních podmínek mohou být využívány jako terapeutické látky ¹⁰⁷.

Druhou skupinou jsou proteinové inhibitory. Databáze MEROPS k dnešnímu dni obsahuje přes 80 rodin proteinových inhibitorů, které využívají velmi různých mechanismů inhibice. Mezi nejvýznamnější rodiny patří cystatiny a serpiny. V této práci bude brán větší zřetel pouze na rodinu cystatinů.

Inhibitory lze dále rozdělit podle mnoha dalších kritérií, kupříkladu podle toho jaké proteasy inhibují, jakým způsobem blokuji aktivní centrum enzymu, nebo podle využívaného inhibičního mechanismu na ireversibilní (většina serpinů) nebo těsně se vázající (cystatiny, tyropiny) ¹⁰⁸.

1.4.2. *BIOLOGICKÉ FUNKCE INHIBITORŮ PROTEAS*

Jak již bylo zmíněno výše, inhibitory mají v organismu ochrannou a regulační roli. Organismus se musí chránit před účinkem proteas především ve dvou případech, prvním nebezpečím jsou organismu vlastní proteasy, které mohou unikat ze svých přirozených rezervoárů ¹⁰⁹. Druhou hrozbou jsou parazitické organismy, pomocí proteas narušující při migraci a výživě integritu tkání hostitele. Jako příklad obrany proti svým vlastním proteasám lze uvést inhibici aktivity cytosolárních kalpainů nebo lysosomálních katepsinů u živočichů. Ochranná role inhibitorů je velmi důležitá zejména u rostlin, které před parazity nemohou uniknout, a proto při obraně před škůdci a různými fytopatogeny spoléhají především na inhibitory těch proteas, které parazité využívají pro vstup do rostliny ^{110, 111}.

Regulační funkce v organismu je neméně důležitá, jelikož rovnováha mezi inhibitory a jimi inhibovanými proteasami v nejrůznějších regulačních kaskádách

(koagulační pochody, apoptóza) umožňuje správný průběh regulačních a signalizačních kaskád založených na proteolytických procesech ¹⁰⁹. Odchytky od této rovnováhy mají za následek mnoho patofyziologických změn. V současné době je známo mnoho dědičných onemocnění, jejichž příčinou jsou mutace ovlivňující vztah proteasa-její inhibitor. Mezi takováto onemocnění patří například rozedma plic ¹¹², různá neurodegenerativní onemocnění, kardiovaskulární onemocnění, poruchy srážení krve, osteoporóza, artritida, Nethertonův syndrom ¹¹³ a epilepsie.

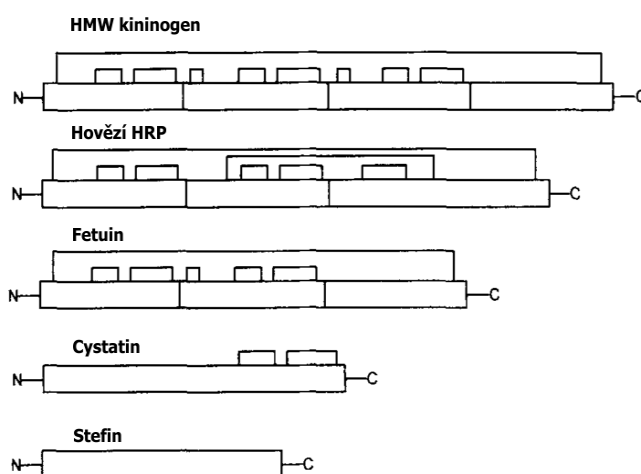
1.4.3. *PROTEASOVÉ INHIBITORY PARASITŮ SAJÍCÍCH KREV*

Podobnou funkční specializaci jako parazitické proteasy podstoupily i proteasové inhibitory, u kterých se vyvinuly nové, specializované funkce, umožňující parazitům jejich způsob života. Množství ektoparazitů i endoparazitů, živící se krví svého hostitele, do jeho krevního oběhu vylučuje látky ovlivňující srážení krve, popřípadě vznik zánětlivé reakce a bylo dokázáno, že za některé tyto děje odpovídají právě proteasové inhibitory ¹¹⁴. Mnoho typu hostitelských krevních buněk (od lymfocytů přes krevní destičky až po žírné buňky) pro správnou funkci svých aktivačních nebo sekrečních procesů vyžaduje aktivitu proteas. Tyto děje jsou cíleně napadány sekretovanými proteasovými inhibitory parazitů. Například inhibitor taeniastatin z tasemnice *Taenia taeniaformis* tlumí nejenom reakce závislé na antigenech a chemokinetickou odpověď neutrofilů ¹¹⁵. Klíšťata jako např. *Ixodes dammini* ve svých slinách vylučuje proteasové inhibitory, které mají antikoagulační a imunosupresivní vlastnosti ¹¹⁴. U parazitických helmintů byly sekretované inhibitory proteas zatím málo studovány ¹¹⁶, příkladem jsou cystatiny sekretované motolicí *F. gigantica* ^{117,118}.

1.5. CYSTATINY

1.5.1. KLASIFIKACE CYSTATINŮ

Cystatiny jsou intenzivně studovanou skupinou proteinových inhibitorů cysteinových proteas. Tato skupina je v databázi MEROPS tvořena jedinou rodinou označovanou jako I25. Zástupci této rodiny se nacházejí u obratlovců, bezobratlých i rostlin. Obecná stavba proteinů této rodiny je velmi proměnlivá a zahrnuje inhibitory s jednou inhibiční cysteinovou doménou i vícedoménové proteiny spojující až 8 cystatinových domén ¹¹⁹ (obr. 1.15). Všichni zástupci z rodiny cystatinů jsou reverzibilními, pevně se vázajícími inhibitory cysteinových proteas (tento pojem bude vysvětlen dále v textu). Jako první byly v roce 1968 identifikovány cystatiny přítomné ve slepičích vejcích ¹²⁰. Hladiny některých cystatinů v lidských tkáních nebo v tělních tekutinách mohou sloužit jako markery pro různá onemocnění ^{121, 122}. Cystatiny lze rozdělit do čtyř skupin (podrodin) podle charakteristických strukturních rysů: stefiny (cystatiny 1. typu), cystatiny (cystatiny 2. typu), kininogeny (cystatiny 3. typu) a proteiny s neinhibující cystatinovou doménou.



Obr. 1.16: Schematické znázornění struktury reprezentativních členů rodiny cystatinů. Zvýrazněny jsou disulfidové můstky a N- a C-konec molekuly. HRP a

fetuin jsou zástupci proteinů s neinhibující cysteinovou doménou. Zkratky: HMW - „High Molecular Weight“, HRG - „Histidine-rich glycoprotein“. Upraveno dle ¹¹⁹.

Cystatiny 1. typu, nazývané stefiny, jsou tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem a mají pouze jednu cystatinovou doménu 1. typu. Molární hmotnost těchto proteinů se pohybuje okolo 11 kDa a mívají zhruba 100 aminokyselin. Jejich molekula neobsahuje žádné disulfidické můstky a není N-glykosylována. Mají zejména intracelulární lokalizaci v cytoplazmě buněk¹²³.

Cystatiny 2. typu se nazývají pravé cystatiny, jsou opět tvořeny pouze jedním polypeptidovým řetězcem a jednou cystatinovou doménou 2. typu. Jsou podobné velikosti jako stefiny, jejich molekulární hmotnost se pohybuje v rozmezí od 10 do 15 kDa a typicky se skládají ze 115 aminokyselin. Obsahují dva disulfidické můstky a bývají N-glykosylovány, případně fosforylovány. Tyto inhibitory jsou z velké většiny extracelulární ¹²³.

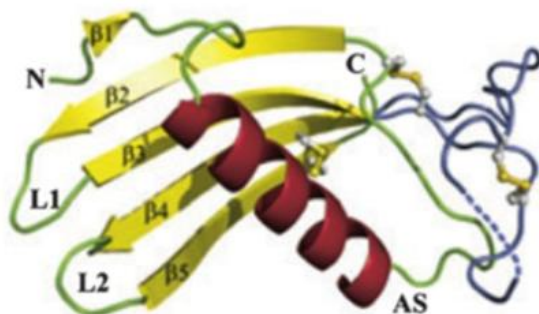
Cystatiny 3. typu, označované jako kininogeny, obsahují tři cystatinové domény 2. typu, z nichž ovšem pouze dvě domény vykazují inhibiční aktivitu. Obecně to jsou velké plazmatické proteiny s M_r od 60 do 120 kDa. Kininogeny jsou prekurzory biologicky aktivních kininů, peptidů přítomných v krvi ^{123, 124}.

Mezi proteiny s neinhibující cystatinovou doménou se řadí řada proteinů, které jsou vícedoménové a obsahují cystatinovou doménu, která neinteraguje s proteasami. Tyto proteiny se považují za evoluční stupeň mezi inhibujícími jednodoménovými cystatiny a vícedoménovými inhibujícími kininogeny, které ztratily svoji původní funkci inhibitorů, ale získaly funkci jinou ^{119, 123}. Někdy jsou kininogeny a proteiny s neinhibující cystatinovou doménou řazeny do stejné podrodiny.

1.5.2. STRUKTURA CYSTATINŮ A MECHANISMUS INHIBICE

Cystatiny 2. typu, dále už pouze cystatiny, jsou pevně se vázající inhibitory cysteinových proteas (z rodin C1 a C13), které interagují s enzymem v poměru 1:1. Pevně se vázající inhibitory jsou speciálním případem reversibilních inhibitorů

vázající enzym tak vysokou afinitou, že jejich kinetika inhibice je blízká kinetice ireversibilních inhibitorů¹²⁵.



Obr. 1.16: Prostorový strukturní model lidského cystatinu C. N označuje N-konec proteinu, který se společně se smyčkami L1 a L2 váže do aktivního místa proteas z rodiny papainu (rodina C1), AS označuje segment cystatinu zodpovědný za inhibici proteas z rodiny legumainu (rodina C13). C značí C-konec proteinu a segmenty β_1 - β_5 vytvářejí pětinasobný beta skládaný list. Upraveno dle¹²⁶.

Molekulová struktura cystatinů vykazuje několik pravidelných konstrukčních prvků. Hlavním strukturním motivem je antiparalelní beta skládaný list tvořený pěti řetězci, který je lehce prohnutý kolem alfa helixu s peti otáčkami¹²⁵. Prostorova struktura lidského cystatinu C je uvedena na obr. 1.18.

U cystatinů je interakce s proteasami z rodiny C1 (rodina papainu) zprostředkována dvěma vysoce konzervovanými smyčkami (na obrázku označeny L1 a L2) a poměrně volným N-koncem enzymu. Smyčka L1 obsahuje klíčové aminokyselinové zbytky Gln-53 a Gly-57, v druhé smyčce hraje zásadní úlohu zbytek tryptofanu¹²⁷. Konformace a prostorové uspořádání interagujících elementů je zcela odlišné od konformace, jakou zaujímá lineární substrát v aktivním místě, jelikož mechanismus inhibice cystatiny je založen na sterickém blokování vstupu substrátu do štěrbinu aktivního místa enzymu.

Jen některé cystatiny jsou schopné inhibovat proteasy z rodiny legumainu (C13)¹²⁸. Za tuto inhibiční aktivitu je zodpovědná smyčka spojující alfa helix

s úsekem beta skládaného listu, která obsahuje konzervovaný asparaginový zbytek. Tato smyčka se nachází na opačném konci molekuly cystatinu, než jsou smyčky L1 a L2, a proto vybrané cystatiny mohou inhibovat proteasy z rodin C13 a C1 najednou a tvořit ternární komplex ¹²⁸.

1.5.3. FYZIOLOGIE CYSTATINŮ

Cystatiny jsou široce rozšířeny u většiny druhů organismů. Inhibice aktivity cysteinových proteas pomocí cystatinu je zásadní pro správný průběh mnoha fyziologických dějů jako je např. imunomodulace neutrofilů či makrofágů ^{129, 130} nebo potlačování růstu nádorů ^{131, 132}. V lidském těle jsou cystatiny přítomné zejména v tělních tekutinách, tedy v krvi, lymfě nebo slinách ¹²³.

U parazitů hrají cystatiny důležitou roli v interakci s imunitním systémem hostitele. Cystatiny byly popsány u třech taxonomických kmenů obsahujících parazitické organismy. Těmi jsou hlístice (Nematoda), motolice (Trematoda) a členovci (Arthropoda) ¹³³. U těchto parazitů byly nalezeny pouze cystatiny 1. a 2. typu (stefiny a cystatiny), kininogeny nebyly u parazitických organismů identifikovány ¹²³. Všechny organismy, u kterých byly nalezeny cystatiny, v určité části svého vývojového cyklu migrují tkáněmi hostitelů (hlístice, motolice) nebo jsou s hostitelskými tkáněmi během sání krve v dlouhodobém kontaktu (klíšřata) ¹³³.

Cystatiny z parazitů jsou zodpovědné za regulaci fyziologických procesů například oogeneze ¹³⁴ nebo svlékání při přechodu mezi jednotlivými larválními stádii a při migraci skrz hostitelské tkáně. Dále se mohou účastnit inhibice parazitických a hostitelských proteas při vývoji parazita ¹¹⁶. Řada parazitárních cystatinů účinně inhibuje aktivitu hostitelských cysteinových proteas a to i těch, které hrají svou roli v imunitním systému a jeho modulaci (např. cysteinových katepsinů). V nedávné době byl prokázán účinek parazitárních cystatinů na buňky prezentující antigen, u nichž tlumí prezentaci antigenů zprostředkovanou MHC II. třídy a modifikují produkci cytokininů a oxidu dusnatého ^{133, 135}. Parazitární cystatiny

nemají pouze funkci inhibitorů proteas, ale mohou pravděpodobně modulovat funkci hostitelského imunitního systému i jako ligandy některých receptorů ^{136, 137}.

2. CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce se zabývá motolicí jaterní (*Fasciola hepatica*), která je jedním z hospodářsky nejvýznamnějších parazitů. Konkrétně je zaměřena na biochemickou charakterizaci proteolytického systému a jeho regulaci. Studované proteiny představují molekulární cíle s potenciálním využitím ve veterinární medicíně.

Dílčí cíle jsou následující:

- 1) Purifikovat rekombinantní formu proteasového inhibitoru FheCy2 exprimovaného motolicí jaterní.
- 2) Identifikovat proteasy obsažené v sekretech motolice jaterní a charakterizovat jejich proteolytickou aktivitu pomocí přístupů enzymologie a funkční proteomiky.
- 3) Určit inhibiční specifitu těchto sekretovaných proteas a analyzovat jejich inhibiční interakci s FheCy2.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. MATERIÁL

3.1.1. REKOMBINANTNÍ CYSTATIN Z MOTOLICE JATERNÍ

Cystatin z *F. hepatica* (značený jako FheCy2) byl připraven jako rekombinantní protein s oligohistidinovou kotvou na C-konci proteinu. Tento cystatin byl produkován expresním systémem využívající kvasinku *Pichia pastoris* do kultivačního média, které bylo po odstředění buněk kvasinek lyofilizováno. Tento výchozí materiál poskytl Dr. Saša Štefanić z Ústav parazitologie na Univerzitě Curych, Švýcarsko.

3.1.2. EXKREČNÍ-SEKREČNÍ PRODUKTY MOTOLICE JATERNÍ

Ze spolupracujícího pracoviště (Dr. Saša Štefanić, Ústav parazitologie, Univerzita Curych, Švýcarsko) bylo získáno několik alikvotů zamražených vzorků médií obsahující exkreční-sekreční produkty (ESP) parazita *F. hepatica*. Sběry probíhaly následujícím způsobem: dospělí jedinci byli kultivováni jednotlivě v RPMI médiu ¹³⁸ nebo v PBS ve dvanáctijamkové kultivační destičce, po 13 hodinách bylo médium odděleno a zamrazeno.

3.2. CHEMIKÁLIE

3.2.1.1. Peptidové substráty

Zásobní roztoky byly připraveny o koncentraci 10 mM v DMSO. V závorkách je uvedena hlavní proteasa, pro jejíž detekci jsou substráty typicky používány.

Bachem, Švýcarsko:

Z-Phe-Arg-AMC (papain, katepsin B/L, trypsin), Z-Arg-Arg-AMC (katepsin B), Gly-Arg-AMC (katepsin C), Z-Ser-Leu-Tyr-AMC (kalpain), Z-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (kaspasa 3), Z-Ala-Ala-Asn-AMC (legumain), Suc-Ser-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (chymotrypsin), MeOSuc-Ser-Ala-Ala-Pro-Val-AMC (elastasa), Leu-AMC (leucinová aminopeptidasa), Z-Gly-Gly-Leu-AMC (subtilisin), Z-Gly-Pro-AMC (prolyl oligopeptidasa), Arg-AMC (katepsin H)

ÚOCHB AV ČR, v.v.i.(zakázková syntéza peptidů):

Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-(NO₂)-Ala-Leu (katepsin D)

3.2.1.2. Inhibitory

V závorkách je uvedena hlavní proteasa, pro kterou jsou inhibitory typicky používány.

Sigma-Aldrich, USA:

E-64 (cysteinové proteasy), pepstatin (aspartátové proteasy), Pefabloc (serinové proteasy)

Bachem, Švýcarsko:

CA-074 (katepsin B)

3.2.1.3. Ostatní chemikálie

Sigma-Aldrich, USA:

TEMED, SDS, močovina, akrylamid, bisakrylamid, BSA, MMTS, papain (papaya latex), DTT, DMSO, glycerol, PEG 1500, CHAPS, TCA, coomassie brilliant blue, Tris, APS

ÚOCHB AV ČR (Dr. M. Nussbaumerová):

fluorescenční afinitní značka BoRC

Lach-ner, ČR:

ethanol, hydroxid sodný, chlorid sodný, kyselina octová, kyselina chlorovodíková, methanol, bromfenolová modř, aceton

Penta, ČR:

glycerol

Fermentas, Lotyšsko:

Standard molekulových hmotností Page Ruler TM- Prestained Protein Molecular Weight Marker

Biorad, USA:

Standard molekulových hmotností Precision Plus ProteinTM All Blue Standards

3.2.2. PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ

Váhy:

Analytické váhy AE 163

Mettler Toledo, Švýcarsko

Předvážky PB 403-S

Mettler Toledo, Švýcarsko

Centrifugy:

Heraeus Biofuge Fresco	DJB Labcare, Velká Británie
GmClab	Gilson, USA
Microcentrifuge 5415 D	Eppendorf, Německo
Allegra® X-15R	Beckman Coulter, USA
Vakuová odparka Speed Vac Concentrator	Thermosavant, USA
Fluorescenční/absorbanční čtečka Infinite® M1000 PRO	Tecan, Rakousko
Spektrofotometr BioSpectrometer KinetiC	Eppendorf, Německo
Vertikální agarosová elektroforéza Horizon	Bio-Rad, USA
Blotovací zařízení	Bio-Rad, USA
pH metr Orion DUAL STAR Meter	Thermo Fisher Scientific, USA
Termoblok QBD4	Grant, Velká Británie
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
ÄKTA Explorer GE	Healthcare Life, Švédsko
Konduktoměr Dual Star	Thermo Scientific, USA
Automatické pipety	Gilson, Francie

Kolony a nosiče:

MonoQ HR 5/5	GE Healthcare Life Sciences, Švédsko
Sephadex G-25, HR 5/5	GE Healthcare Life Sciences, Švédsko
Superdex 75 HR 16/30	GE Healthcare Life Sciences, Švédsko
Ni-NTA Superflow	Qiagen, Německo

Komerční soupravy:

BCA Protein Assay Kit

Thermo Scientific, USA

Ostatní vybavení:

Superloop 50 ml

GE Healthcare Life, Švédsko

PVDF fluoridová membrána

Millipore, USA

Koncentrátory Amicon 4

Millipore, USA

Filtr Hydrophilic PES 0,22 µm

Millipore, USA

UltrafreeMC Microcentrifuge filter 0,22 µM

Millipore, USA

3.3. METODY

3.3.1. CHROMATOGRAFICKÉ METODY

3.3.1.1. Gelová chromatografie na koloně Sephadex G-25

V 50 ml destilované vody bylo rozpuštěno 6,5 g lyofilizovaného média po expresi FheCy2 kvasince *P. pastoris* (kap. 3.1.1.). Takto vzniklý roztok byl centrifugován po 10 min při 10 000 g a supernatant byl nanesen na kolonu Sephadex G-25 (3,2 cm x 60 cm) ekvilibrovanou destilovanou vodou. Průtok kolonou byl nastaven na 2 ml/min a byly sbírány frakce o objemu 10 ml. Celý proces byl prováděn v chladové místnosti, při teplotě 10 °C. Obsah proteinů v jednotlivých frakcích byl monitorován měřením absorbance při 280 nm. Obsah solí byl ve frakcích analyzován měřením konduktivity. Míra inhibice byla kvantifikována pomocí kinetického testu s papainem a fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC (kap. 3.3.4.5.). Pro měření inhibice bylo odebíráno 10 µl frakce.

3.3.1.2. Iontoměničová chromatografie na koloně Mono Q

Proteinová frakce po gelové chromatografii na koloně Sephadex G-25 byla separována iontoměničovou chromatografií na anexové koloně Mono Q HR 5/5

pomocí FPLC. Podle teoretického izoelektrického bodu FheCy2 o hodnotě pI 7,2 bylo zvoleno pH nanášecího pufru pro chromatografii na Mono Q koloně na pH 8-10. K 25 ml proteinové bylo přidáno 25 ml nanášecího pufru na celkový objem 50 ml. Kolona byla ekvilibrována 5 ml nanášecího pufru. Po nanesení vzorku byla kolona promyta dalšími 5 ml nanášecího pufru a eluce byla prováděna elučním pufrům s lineárním gradientem 0-1 M NaCl (1 % za min). Sbírány byly frakce o objemu 2 ml a průtok kolonou byl nastaven na 1 ml/min. Průběh separace byl monitorován měřením absorbance při 280 nm. Míra inhibice byla kvantifikována pomocí kinetického testu s papainem a fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC (kap. 3.3.4.5.). Pro měření inhibice bylo odebíráno 10 µl z frakce.

Nanášecí pufr: 20 mM Tris, pH 7,5, 8,5 nebo 20 mM ethanolamin, pH 9,5, 10,0

Eluční pufr: 20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7,5, 8,5 nebo 20 mM ethanolamin, 1 M NaCl, pH 9,5, 10,0

3.3.1.3. Afinitní chelatační chromatografie

Proteinová frakce po gelové chromatografii na koloně Sephadex G-25 byla separována pomocí afinitní chromatografie s nosičem Ni-NTA Superflow. Na ionty niklu imobilizované na nosiči se vázal histidinový hexapeptid připojený k rekombinantnímu FheCy2 na jeho C-konci. Navázaný protein byl z kolony následně kompetitivně vytěsněn imidazolem.

Kolona o objemu 5 ml byla promyta postupně 25 ml vody, 25 ml 6M guanidinu a 25 ml ekvilibračního pufru. K 370 ml roztoku proteinové frakce bylo přidáno 41 ml koncentrovaného ekvilibračního pufru a upraveno pH na hodnotu 8,0. Po nanesení vzorku na kolonu byla kolona promyta 25 ml ekvilibračního pufru a poté 25 ml promývacího pufru. FheCy2 by eluován pomocí elučního pufru obsahujícího 250 mM imidazol. Průtoková rychlost kolony byla 1 ml/min a frakce byly sbírány po 2 ml. Průběh purifikace byl kontinuálně monitorován pomocí měření absorbance při 280 nm. Jednotlivé frakce byly následně analyzovány pomocí SDS-

PAGE a pomocí inhibičního kinetického testu s papainem a s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC (kap. 3.3.4.5.). Pro měření inhibice bylo odebíráno 10 μ l z frakce.

Ekvilibrační pufr: 50 mM NaH₂PO₄, 0,3 M NaCl, pH 8,0

Promývací pufr: 50 mM NaH₂PO₄, 0,3 M NaCl, 0,02 M imidazol, pH 8,0

Eluční pufr: 50 mM NaH₂PO₄, 0,3 M NaCl, 0,25 M imidazol, pH 8,0

3.3.1.4. Gelová chromatografie na koloně Superdex 75

Frakce s nejvyšším obsahem FheCy2 z afinitní chromatografie byly spojeny (celkem 6 ml) a pomocí koncentrátoru Amicon Ultra byly při 10 000 g koncentrovány na celkový objem 2 ml. Kolona Superdex 75 HR 16/30 (120 ml) byla ekvilibrována pufrům a byly na ní naneseny 2 ml vzorku. Průtok kolonou byl nastaven na 1 ml/min, frakce byly sbírány po 1 ml a průběh chromatografie byl sledován pomocí kontinuálního měření absorpance při 280 nm. Frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a pomocí inhibičního kinetického testu s papainem a substrátem Z-Phe-Arg-AMC (kap. 3.3.4.5.). Pro měření inhibice byly odebírány 2 μ l z frakce. Frakce obsahující FheCy2 byly spojeny, a pomocí koncentrátoru Amicon Ultra byly postupně promyty 30 ml vody tak, aby došlo k vyředění soli z 0,3 M NaCl na cca 20 mM NaCl a nakonec byly zahuštěny na koncentraci proteinu 5 mg/ml.

Ekvilibrační pufr: 20 mM TRIS, 0,3 M NaCl, pH 8,0

3.3.2. PRECIPITAČNÍ METODY

3.3.2.1. Acetonová precipitace proteinů

Pro precipitaci proteinu bylo k roztoku vzorku přidáno čtyřnásobné množství vychlazeného acetonu tak, aby byl aceton 80%. Roztok byl následně ponechán 2 hod při -20 °C, následně centrifugován (10 min, 10 000 g, 4 °C), supernatant oddělen centrifugací a sediment vysušen pomocí vakuové odparky SpeedVac. Při přípravě vzorků k elektroforéze na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (SDS PAGE)

bylo k vysušenému vzorku přidáno 12 µl vzorkového pufru pro SDS PAGE (kap. 3.3.3.2.) a směs byla inkubována 5 min při 95 °C.

3.3.3. ANALYTICKÉ METODY

3.3.3.1. Stanovení obsahu proteinů ve vzorku

Pro stanovení obsahu proteinů v analyzovaných roztocích byla použita komerční sada „BCA Protein Assay Kit“. Základem této metody je schopnost proteinů redukovat ionty mědi z Cu^{2+} na Cu^{+} , které reagují s BCA na barevný komplex, snadno detekovatelný díky absorpčnímu maximu při 562 nm. Koncentrace proteinů a absorbance komplexu jsou lineárně závislé. Kalibrační přímka byla sestrojena pomocí BSA standardů o definovaných koncentracích v rozmezí 0,5-5 mg/ml.

Měření bylo prováděno v mikrotitrační destičce, do jamky bylo přidáno 10 µl vzorku nebo standardu a 200 µl BCA činidla. Po 15 min inkubace při 37 °C byla změřena absorbance při 562 nm. Koncentrace proteinů byla odečtena ze sestrojené kalibrační přímky.

3.3.3.2. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS

Separační 15% gely byly připravovány dle Laemmliho ¹³⁹. Do jamek na vertikální elektroforéze Bio-Rad, s rozměry gelu 80 x 60 x 0,7 mm, byly nanášeny vzorky o objemu 12 µl. V průběhu elektroforézy bylo prvních 15 min používáno napětí 90 V poté 120 V. Po ukončení elektroforézy byly gely fixovány po dobu 15 min v roztoku obsahující 50% ethanol a 12% kyselinu octovou. Proteiny byly následně detekovány pomocí barvení roztokem coomassie brilliant blue ¹⁴⁰ nebo metodou stříbrného barvení dle Bluma ¹⁴¹.

Složení zásobního 6x koncentrovaného roztoku vzorkového pufru pro SDS PAGE bylo následující: 100 mM Tris-HCl pH = 6,8, 30% glycerol, 10% SDS, 0,6 M DTT, 0,18 mM bromfenolová modř.

3.3.3.3. Přenos proteinů na membránu

Proteiny byly přenášeny z gelu SDS PAGE na PVDF membránu pomocí elektroblotování. Gel, podložky, filtrační papíry a PVDF membrána byly ekvilibrovány 15 min v přenosovém pufru (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glycin, 20% methanol) a poté byly sestaveny v pořadí: anoda, podložka, filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír, podložka, katoda. Přenos proteinů na membránu byl zajištěn díky konstantnímu napětí 100 V po dobu 60 min. Proteiny na membráně byly barveny pomocí roztoku coomasie brilliant blue ¹⁴⁰. Membrána byla odbarvena 50% metanolem a třikrát promyta ve vodě po 15 min.

3.3.3.4. Určení N-koncové sekvence aminokyselin

Vzorek frakce z afinitní chromatografie obsahující FheCy2 byl po separaci pomocí SDS PAGE přenesen na PDVF membránu. Část membrány obsahující FheCy2 byla vystřižena a analyzována pomocí automatického Edmanova odbourávání pro ověření N-koncové sekvence aminokyselin. Sekvenační analýza byla provedena Ing. Zdeňkem Voburkou z ÚOCHB AV ČR na proteinovém sekvenátoru ABI Procise 491. Identifikovaná N-koncová sekvence Ile-Arg-Gly-Glu-Met-Leu odpovídala sekvenci očekávaného konstruktu rekombinantního proteinu.

3.3.3.5. Značení pomocí aktivní fluorescenční značky

Pro značení papainových proteas byla využita aktivní fluorescenční značka BoRC. Reakční směs o celkovém objemu 20 µl obsahovala 10 µl vzorku proteas, 2,5 mM DTT, 0,1 % PEG 1500 a 0,1 M citrát-fosfátový pufr pH 5,0. Inhibovaná kontrola navíc obsahovala 10 µM E-64. Tyto směsi byly ponechány 15 min při 37 °C a poté byla přidána aktivní fluorescenční značka BoRC na finální koncentraci 1 µM a reakční směs inkubována další 1 hod. Veškeré inkubace probíhaly ve tmě.

Značení proteas bylo ukončeno pomocí acetonové precipitace proteinů (kap. 3.3.2.1). K vysušenému precipitátu bylo přidáno 12 µl vzorkového pufru a vzorky byly separovány na SDS PAGE. Po ukončení elektroforézy byl gel promyt 4x 15 min

v destilované vodě. Následně byl gel analyzován na fluorescenčním skeneru Typhoon při excitační vlnové délce 532 nm a s emisním filtrem na 550 nm.

3.3.4. MĚŘENÍ ENZYMOVÝCH AKTIVIT

3.3.4.1. Proteolytická aktivita s nespecifickými proteinovými substráty

Azokasein, azokolagen a elastin congo red jsou chromogenní proteiny značené sulfanilamidovou skupinou (azokasein, azokolagen) nebo konžskou červení (elastin congo red). Štěpením těchto substrátů vznikají rozpustné fragmenty, které jsou separovány a kvantifikovány měřením absorbance. Pro analýzu aktivity sekretovaných proteas s těmito substráty byly použity exkreční-sekreční produkty v PBS médium (kap. 3.1.2.). Jako pufr byl použit pufr Britton-Robinson obsahující 0,2 M kyselinu boritou, 0,2 M kyselinu octovou a 0,2 M kyselinu fosforečnou.

(A) Stanovení aktivity s azokaseinem

Reakční směs (150 μ l):

88,5 μ l 0,2 M Britton-Robinson pufr pH 3,0-10,0

1,5 μ l 0,25 M DTT

10 μ l média obsahující ESP

50 μ l roztoku azokaseinu (20 mg/ml) v 1 M močovíně

Reakční směs byla inkubována po 2,5 h při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 300 μ l 6% TCA a inkubována 30 min při 4 °C. Dále byla směs centrifugována po 10 min při 10 000 g a bylo odebráno 330 μ l supernatantu do mikrotitrační destičky. Absorbance při 360 nm byla měřena na čtečce Tecan Infinite M1000 proti příslušnému blanku (kontrolnímu vzorku s vodou místo média s ESP sekrety z *F. hepatica*). Tento základní aktivitní test byl modifikován pro stanovení aktivity v přítomnosti proteasových inhibitorů. Zásobní roztok inhibitoru byl

pipetován do reakční směsi na tyto finální koncentrace: 1 μM E-64, 10 μM CA 074, 10 μM pepstatin, 1 mM Pefabloc a 0,5 μM FheCy2.

(B) Stanovení aktivit s azokolagenem

Reakční směs (200 μl):

88 μl 0,2 M Britton-Robinson pufr pH 5,0

2 μl 0,25 M DTT

10 μl média obsahující ESP

100 μl roztok azokolagenu (10 mg/ml)

Reakční směs byla inkubována na třepačce (800 RPM) po 24 hod při pokojové teplotě a poté byla centrifugována 15 min při 10 000 g. 180 μl supernatantu bylo odebráno do mikrotitrační destičky a absorbance při 520 nm byla měřena na čtečce Tecan Infinite M1000 proti příslušnému blanku (kontrolnímu vzorku s vodou místo média s ESP sekrety z *F. hepatica*)

Tento základní aktivitní test byl modifikován pro stanovení aktivity médií v přítomnosti různých inhibitorů. Zásobní roztok inhibitoru byl pipetován do reakční směsi na tyto finální koncentrace: 1 μM E-64, 10 μM CA 074, 10 μM pepstatin, 1 mM Pefabloc a 0,5 μM FheCy2.

(C) Stanovení aktivity s elastinem congo red

Reakční směs (300 μl):

87 μl Britton-Robinson pufr pH 5,0

3 μl 0,25 M DTT

10 μl média obsahující ESP

200 μl roztok elastinu congo red (10 mg/ml)

Reakční směs byla inkubována na třepačce (800 RPM) po 24 hod při pokojové teplotě a poté byla centrifugována 20 min při 10 000 g. 250 µl supernatantu bylo odebráno do mikrotitrační destičky a absorbance při 490 nm byla měřena na čtečce Tecan Infinite M1000 proti příslušnému blanku (kontrolnímu vzorku s vodou místo média s ESP sekrety z *F. hepatica*)

Tento základní aktivitní test byl modifikován pro stanovení aktivity médií v přítomnosti různých inhibitorů. Zásobní roztok inhibitoru byl pipetován do reakční směsi na tyto finální koncentrace: 1 µM E-64, 10 µM CA 074, 10 µM pepstatin, 1 mM Pefabloc a 0,5 µM FheCy2.

1.1.1.1. Proteolytická aktivita s fluorogenními peptidovými substráty

Pro měření proteolytické aktivity s fluorogenními peptidovými substráty byly použity substráty značené 7-amino-4-methylcoumarinem (AMC, excitační vlnová délka 360 nm, emisní vlnová délka 465nm ¹⁴²) a FRET substrát značený 2-aminobenzoylem (Abz, excitační vlnová délka 330 nm, emisní vlnová délka 410 nm ¹⁴³). V těchto testech byly analyzovány exkreční-sekreční produkty v RPMI médiu (kap. 3.1.2.).

(A) Optimalizace kinetického testu

V prvním kroku bylo nastaveno optimální množství proteolytické aktivity analyzované v testu tak, aby fluorescence produktu štěpení vzrostla o 30 000 RFU (relativní fluorescenční jednotky) během 15 min. Takto zjištěné množství bylo následně používáno v inhibičních testech nebo při testování vlivu pH na aktivitu.

Při stanovování optimálního množství papainu nebo média s ESP bylo nejprve do jednotlivých jamek mikrodestičky pipetováno 80 µl enzymové směsi. Destička byla protřepána a inkubována při 37 °C 10 min. Poté bylo přidáno 20 µl substrátové směsi vytemperované na 37 °C a bylo zahájeno měření na fluorescenční čtečce Tecan Infinite M1000.

Reakční směs (100 μ l):

Enzymová směs: 0,1 M citrát-fosfát pH 5,0, 2,5 mM DTT, 0,1 % PEG 1500, 5 μ l média s ESP (neředěného nebo 100x ředěného) nebo 5 μ l papainu (3 ng/ml)

Substrátová směs: 0,1 M citrát-fosfát pH 5,0, 20 μ M Z-Phe-Arg-AMC

Koncentrace všech látek, mimo pufru, jsou přepočteny na finální koncentraci ve 100 μ l směsi.

(B) *Určení závislosti proteasových aktivity na pH*

Do jednotlivých jamek mikrodestičky bylo pipetováno 80 μ l enzymové směsi. Tato směs byla protřepána a inkubována při 37 °C po 10 min. Poté bylo přidáno 20 μ l substrátové směsi vytemperované na 37 °C, čímž byla zahájena reakce. Aktivita byla určena měřením fluorescence (v RFU) na čtečce Tecan Infinite M1000 po dobu 15 min a vyjádřena jako počáteční rychlost štěpení substrátu.

Reakční směs (100 μ l):

Enzymová směs: 0,2 M Britton-Robinson pufr pH 3,0-10,0, 2,5 mM DTT, 0,1 % PEG 1500, 5 μ l 100x ředěného média s ESP

Substrátová směs: 0,2 M Britton-Robinson pufr (pH 3,0-10,0), 20 μ M Z-Phe-Arg-AMC nebo Z-Ser-Leu-Tyr-AMC

Koncentrace všech látek, mimo pufru, jsou přepočteny na finální koncentrace ve 100 μ l směsi.

(C) *Měření inhibice proteolytické aktivity*

Základní kinetický test pro jednotlivé fluorogenní substráty (viz předchozí sekce) byl modifikován pro měření aktivity v přítomnosti proteasových inhibitorů. Do jednotlivých jamek mikrodestičky bylo pipetováno 80 μ l enzymové směsi. Tato

směs byla protřepána a inkubována při 37 °C po 10 min. Poté bylo přidáno 20 µl substrátové směsi vytemperované na 37 °C, čímž byla zahájena reakce. Aktivita byla určena měřením fluorescence (v RFU) na čtečce Tecan Infinite M1000 po dobu 15 min a vyjádřena jako počáteční rychlost štěpení substrátu.

Reakční směs (100 µl):

Enzymová směs: 0,1 M citrát-fosfát pH 3,0, 5,0, 8,0, 2,5 mM DTT, 0,1% PEG 1500, 5 µl media s ESP (neředěné a 100x ředěné), 1 µl inhibitoru s finální koncentrací 1 µM E-64, 10 µM CA 074, 1 mM Pefabloc, 10 µM pepstatin a 0,5 µM FheCy2

Substrátová směs: 0,1 M citrát-fosfát pH 3,0, 5,0, 8,0, 20 µM substrát (Z-Phe-Arg-AMC, Z-Arg-Arg-AMC, Gly-Arg-AMC, Z-Ser-Leu-Tyr-AMC, Z-Asp-Glu-Val-Asp-AMC, Z-Ala-Ala-Asn-AMC, Z-Ser-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, MeOSuc-Ser-Ala-Ala-Pro-Val-AMC, Arg-AMC, Leu-AMC, Z-Gly-Gly-Leu-AMC, Z-Gly-Pro-AMC, Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-(NO₂)-Ala-Leu

3.3.4.2. Určení inhibičních parametrů FheCy2

(A) *Inhibice papainu pomoci FheCy2*

Kineticky inhibiční test s papainem a FheCy2 byl modifikován z aktivitního testu s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC s optimalizovanou koncentrací papainu (kap. 3.3.4.2.).

Do jednotlivých jamek mikrodestičky bylo pipetováno 80 µl enzymové směsi (obsahující 10 µl roztoku FheCy2 z chromatografické frakce), tato směs byla protřepána a inkubována 10 min při 37 °C. Poté bylo přidáno 20 µl substrátové směsi vytemperované na 37 °C, čímž byla zahájena reakce. Zbytková aktivita byla měřena na fluorescenční čtečce Tecan Infinite M1000.

Míra inhibice byla vypočítána ze získaných počátečních rychlostí reakce pomocí vztahu:

$$\text{účinnost inhibice [\%]} = \left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right) \cdot 100,$$

kde v_0 (resp. v_i) je počáteční rychlost reakce bez (resp. s) inhibitorem.

Reakční směs (100 μ l):

Enzymová směs: 0,1 M citrát-fosfát pH 5,0, papain (3 ng/ml), 2,5 mM DTT, 0,1% PEG 1500, 10 μ l chromatografické frakce

Substrátová směs: 0,1 M citrát-fosfát pH 5,0, 20 μ M Z-Phe-Arg-AMC

Koncentrace všech látek, mimo pufru, jsou přepočteny na finální koncentrace ve 100 μ l směsi.

A) *Určení hodnoty IC₅₀*

K této analýze byl použit analogicky kinetický inhibiční test jako v kap. 3.3.4.2. pro systém s médiem obsahujícím ESP a s fluorogenními substráty Z-Phe-Arg-AMC a Z-Ser-Leu-Tyr-AMC. Za účelem určení hodnoty IC₅₀ byla měřena inhibice aktivit ESP v přítomnosti různých koncentrací FheCy2 (0-5 μ M).

Míra inhibice byla vypočítána ze získaných počátečních rychlostí reakce, a pro lepší orientaci přepočítána na procenta pomocí vztahu

$$\text{účinnost inhibice [\%]} = \left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right) \cdot 100$$

kde v_0 (resp. v_i) je počáteční rychlost reakce bez (resp. s) inhibitorem.

Ze závislosti hodnot účinnosti inhibice na koncentraci inhibitoru byla pomocí programu Grafit 5.0.4 (Erithacus Software Limited) nelineární regresí vypočtena hodnota IC₅₀.

Reakční směs (100 μ l):

Enzymová směs: 0,1 M citrát-fosfát pH 5,0, 2,5 mM DTT, 0,1% PEG 1500, 5 μ l 100x ředěného média s ESP, 0-5 μ M FheCy2

Substrátová směs: 0,1 M citrát-fosfát pH 5,0, 20 μ M Z-Phe-Arg-AMC nebo Z-Ser-Leu-Tyr-AMC

Koncentrace všech látek, mimo pufru a ESP médií, jsou přepočteny na finální koncentrace ve 100 μ l směsi.

4. VÝSLEDKY

4.1. IZOLACE REKOMBINANTNÍHO CYSTATINU FHECY2 Z *F. HEPATICA*

Na genové úrovni byl u motolice jaterní (*F. hepatica*) identifikován nový cystatin FheCy2 v rámci společného projektu ÚOCHB AV ČR, Praha a Ústavu parazitologie, Univerzita Curych, Švýcarsko (Dr. Saša Stefanič, nepublikované výsledky).

Tento je složen ze 116 aminokyselin a neobsahuje žádné potencionální N-glykosylační místo (k predikci bylo využito nástrojů webového portálu ExPASy¹⁴⁴). Na spolupracujícím pracovišti byl připraven konstrukt pro expresi FheCy2, rekombinantní varianta (bez signální sekvence) je složena ze 110 aminokyselin a na C-konci proteinu má inserci šesti histidinových zbytků, tvořící histidinovou kotvu.

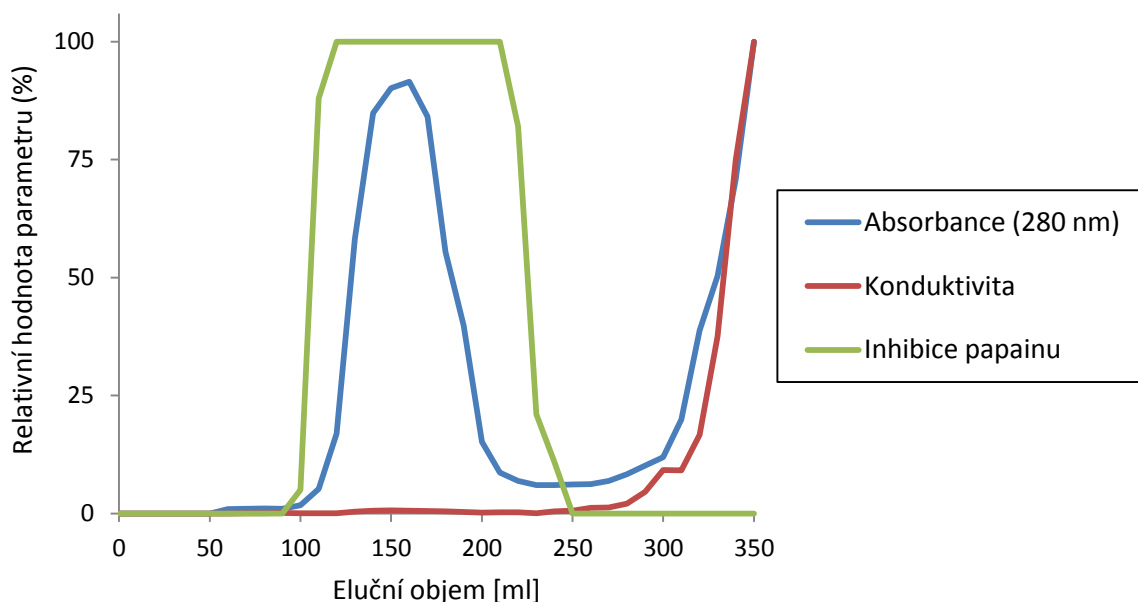
Jako expresní systém byla využita kvasinka *Pichia pastoris*. Lyofilizované kvasinkové médium obsahující rekombinantní cystatin FheCy2 bylo získáno ze spolupracujícího pracoviště a představuje vstupní materiál pro purifikaci FheCy2, popsanou v diplomové práci.

4.1.1. PŘÍPRAVA PROTEINOVÉ FRAKCE POMOCÍ GELOVÉ CHROMATOGRAFIE

V prvním kroku izolace rekombinantního FheCy2 byl lyofilizát média kvasinky *P. pastoris* rozpuštěn ve vodě a rozdělen pomocí gelové chromatografie na koloně G-25 ekvilibrované destilovanou vodou (obr. 4.1, str. 63).

Výsledkem této gelové chromatografie bylo oddělení frakcí obsahujících proteiny od solí a dalších nízkomolekulárních složek kultivačního média. U proteinových frakcí byla testována schopnost inhibovat proteolytickou aktivitu papainu (obr. 4.1, str. 63). Papain byl použit jako modelová cysteinová proteasa, pro kterou je předpokládána inhibiční interakce s cystatiny, včetně FheCy. Frakce

vykazující vysoký obsah proteinů a inhibiční aktivitu byly spojeny a dále purifikovány pomocí iontoměničové chromatografie.



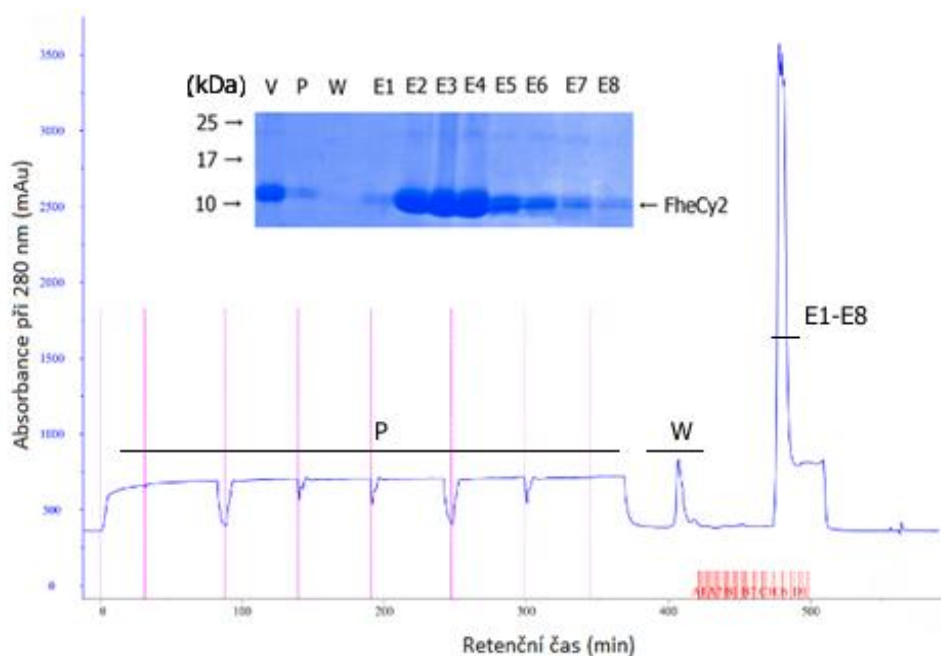
Obr. 4.1: Purifikace FheCy2 pomocí gelové chromatografie na koloně Sephadex. Kolona Sephadex G-25 (3,2 x 60 cm) byla ekvilibrována destilovanou vodou. Průběh izolace byl monitorován měřením absorbance při 280 nm (modrá křivka), konduktivity (červená křivka) a pomocí kinetického testu byla stanovena inhibice proteolytické aktivity papainu (zelená křivka). Na ose x je vynesena eluční objem v ml, na ose y jsou vyneseny normalizované měřené parametry.

Pro spojenou proteinovou frakci po gelové chromatografii byl hledán další vhodný chromatografický krok pro purifikaci FheCy2. Úvodní experiment byl proveden pomocí iontoměničové chromatografie na koloně MonoQ HR 5/5 na přístroji ÄKTA Purifier FPLC. Pro vazbu FheCy2 na nosič byly testovány podmínky 20 mM pufrů Tris (pH 7,5-9,0) nebo etanolamin (pH 9,5-10,0) v souladu s predikovaným izoelektrickým bodem pro rekombinantní FheCy2 ($pI = 7,2$). Získané eluční chromatogramy z těchto iontoměničových chromatografií nicméně neukázaly dobrou separaci složek výchozího materiálu, a proto byla jako alternativní krok dále testována chelatační chromatografie.

4.1.2. AFINITNÍ SEPARACE FHECY2 POMOCÍ CHELATAČNÍ CHROMATOGRAFIE

V dalším purifikačním kroku byla použita afinitní chromatografie na komerčním nosiči Ni-NTA. Tento nosič obsahuje imobilizované kationy niklu, které pomocí koordinačně kovalentní vazby interagují s histidinovou kotvou připojenou na rekombinantní protein.

FheCy2 navázaný na koloně pomocí C-koncové histidinové kotvy byl z kolony uvolňován pomocí 250 mM imidazolu obsaženém v elučním pufru, který s histidinovou kotvou kompetuje o volné valence nikelnatých kationů. Proteinová frakce po úvodní gelové chromatografii na koloně Sephadex G-25 byla nanesena na kolonu s Ni-NTA nosičem (kap. 3.3.1.3.) a záznam s průběhem afinitní chromatografie je na obr. 4.2. Eluční frakce byly analyzovány pomocí SDS PAGE (obr 4.2), což prokázalo přítomnost FheCy2 (pás s relativní molekulovou hmotností 12 kDa) ve specificky eluovaných materiálech.

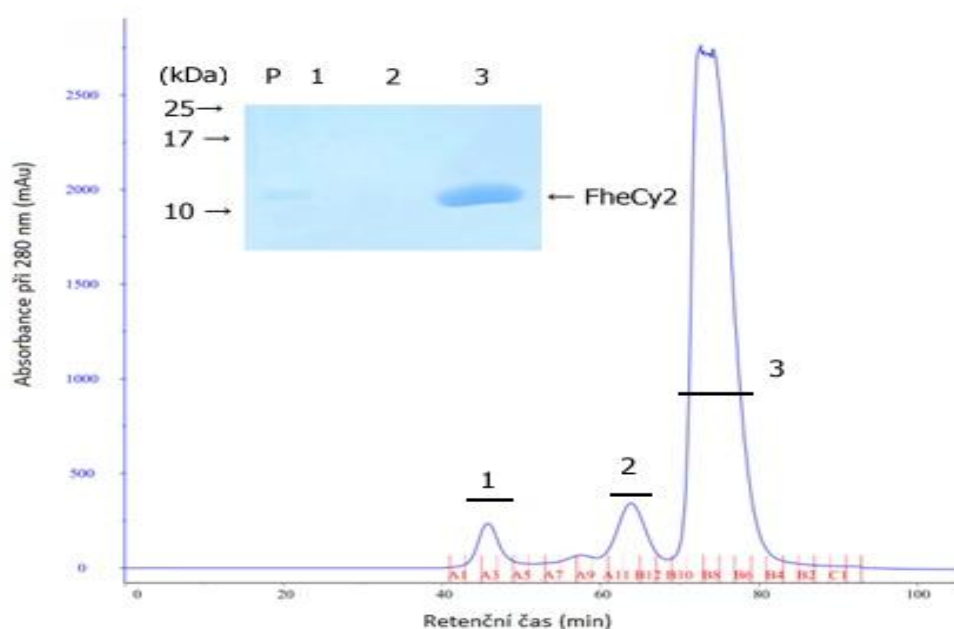


Obr. 4.2: Afinitní chromatografie na nosiči Ni-NTA. Vrchol P odpovídá materiálu, který se nenavázal na nosič, vrchol W odpovídá vymývání nespecificky navázaných proteinů pomocí 20 mM imidazolu a vrchol E1-E8 odpovídá eluci specificky

vázaného FheCy2 obsahujícího histidinovou kotvu pomocí 250 mM imidazolu. Na ose y je vynesena absorbance při 280 nm v mAU, na ose x eluční objem v ml. **Vložený obr.:** V označuje výchozí vzorek nanesený na kolonu, P označuje materiál, který se na kolonu nanavázal. W označuje frakci nespecificky vázaných proteinů a E₁-E₈ jsou jednotlivé specificky eluované frakce. Proteiny jsou barveny Coomassie Brilliant Blue. Uvedeny jsou relativní molekulové hmotnosti proteinových standardů.

4.1.3. ZÁVĚREČNÁ PURIFIKACE FHECY2 POMOCÍ GELOVÉ CHROMATOGRAFIE

Frakce z afinitní chelatační chromatografie obsahující FheCy2 byly spojeny a koncentrovány na celkový objem 2 ml pomocí koncentrátorů Amicon Ultra (pro koncentrování proteinu s molekulovou hmotností nad 3 kD) Tento materiál byl použit pro závěrečný krok purifikace, jako který byla zvolena gelová chromatografie (na koloně Superdex 75 HR 16/30) vhodná pro plánované krystalizační experimenty s FheCy2 (obr. 4.3).



Obr. 4.3: Purifikace FheCy2 pomocí gelové chromatografie na koloně Superdex 75. Na kolonu ekvilibrovanou 20 mM Tris pufrem pH 8,0 obsahující 0,3 M NaCl byly

naneseny spojené eluční frakce po afinitní chromatografii. Průběh chromatografie byl sledován pomocí kontinuálního měření absorbance při 280 nm (modře, osa y). Vrcholy označené 1 a 2 obsahují balastní makromolekuly o vyšších molekulových hmotnostech. Vrchol 3 odpovídá FheCy2 o relativní molekulové hmotnosti 11,7 kDa. **Vložený obr.:** SDS PAGE analýza vzorku nanášeného na kolonu (P) a frakcí z jednotlivých (1, 2, 3) vrcholů afinitní chromatografie. Proteiny jsou barveny Coomassie Brilliant Blue. Uvedeny jsou relativní molekulové hmotnosti proteinových standardů. Frakce z vrcholu 3 inhibovaly v kinetickém testu proteolytickou aktivitu papainu.

U jednotlivých frakcí byla testována inhibice aktivity proteolytické papainu pomocí aktivního kinetického testu s fluorogenním substrátem. Tři frakce s nejvyšším obsahem inhibitoru FheCy2 byly následně spojeny a pomocí koncentrátoru Amicon Ultra (limit 3 kDa) promyty patnácti objemy vody tak, aby koncentrace NaCl v roztoku byla nejvýše 20 mM NaCl. Přitom byly frakce koncentrovány na výslednou koncentraci proteinu 5 mg/ml.

Získaný zásobní roztok FheCy2 byl rozdělen na alikvoty a skladován při -80 °C. Tento materiál byl používán na další inhibiční testy s proteasami z *F. hepatica*.

4.2. AKTIVITA A INHIBICE SEKRETOVANÝCH PROTEAS Z *F. HEPATICA*

Tato kapitola se zabývá biochemickou analýzou proteas, které jsou sekretovány dospělci motolice jaterní (*F. hepatica*). K analýze byla použita kultivační média obsahující sekretované produkty motolic označované jako ESP (exkreční-sekreční produkty), která byla získána in vitro inkubací dospělců na spolupracujícím pracovišti na Ústavu parazitologie, Univerzita Curych, Švýcarsko. Výchozí materiál zamražených médií (kap. 3.1.2.) byl studován enzymologicky v aktivních a inhibičních testech a dále moderními vizualizačními metodami funkční proteomiky.

4.2.1. ANALÝZA PROTEOLYTICKÉ AKTIVITY S PROTEINOVÝMI SUBSTRÁTY

Pro analýzu proteolytické aktivity v médiích obsahujících ESP z *F. hepatica* byla použita sada proteinových chromogenních substrátů, konkrétně azokasein, azokolagen a derivát elastinu „elastin congo red“.

4.2.1.1. Proteolytická aktivita a inhibice s azokaseinovým substrátem

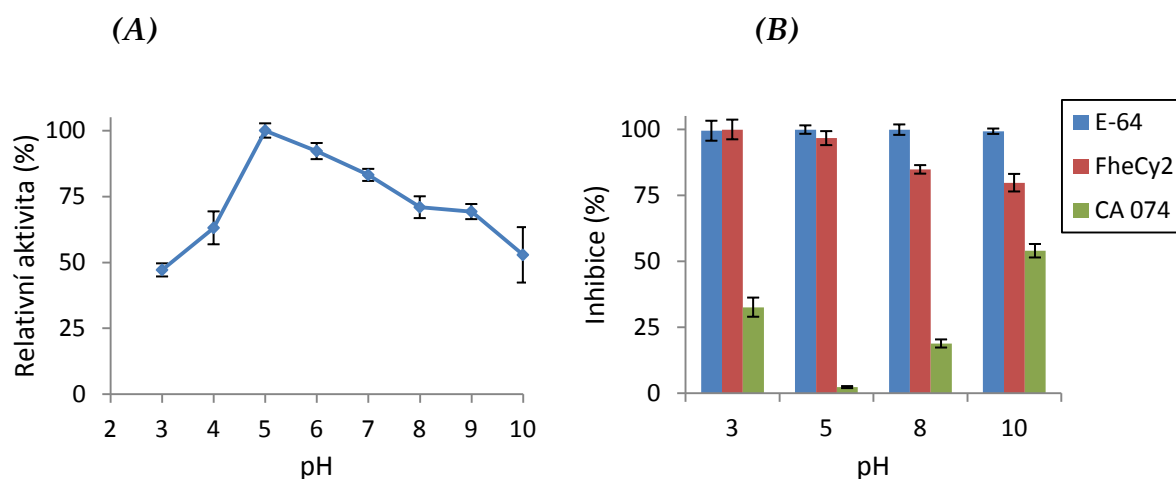
Prvním krokem k analýze proteas v ESP sekretech *F. hepatica* bylo testování jejich aktivity a nalezení pH optima pomocí nespecifického proteinového substrátu – azokaseinu (obr. 4.4 A na str. 66). Nejvyšší aktivita byla zaznamenána při pH 5,0, s prudkým nárůstem od nižších hodnot pH a s postupným poklesem aktivity přes neutrální oblast do zásadité oblasti. Ve středně kyselé oblasti se nachází pH optimum především cysteinových a aspartátových proteas a částečně také některých aspartátových proteas. Více informací o distribuci sekretovaných proteas bylo získáno pomocí jejich inhibiční specifity. Aktivitu proteas lze selektivně inhibovat pomocí specifických inhibitorů, kterými lze cíleně blokovat funkci pouze určitého typu proteas, zatímco ostatní proteasy nejsou ovlivněny.

K důkazu přítomnosti cysteinových proteas v ESP sekretech *F. hepatica* byl použit inhibiční test s azokaseinem (kap. 3.3.4.4.) provedený v přítomnosti specifických inhibitorů E-64 (skupinový inhibitor proteas papainové rodiny), CA-074 (inhibitor papainových proteas typu kateopsinu B) a dále také testován inhibiční vliv rekombinantního cystatinu FheCy2 z *F. hepatica*. Do reakční směsi na výslednou koncentraci byl přidán inhibitor E-64 10 μM , CA-074 10 μM a FheCy2 0,5 μM . Míra inhibice byla měřena při čtyřech vybraných hodnotách pH pokrývajících škálu nalezené proteolytické aktivity (pH: 3,0, 5,0, 8,0, 10,0).

Naměřená data jsou uvedena v obr. 4.4 B na str. 66, Tato inhibiční analýza ukázala, že aktivita byla zcela inhibována E-64, z čehož vyplývá, že hlavní proteolytické enzymy v ESP sekretech z *F. hepatica* náleží k cysteinovým proteasam

papainové rodiny. Nalezena byla dále pouze částečná inhibice CA-074, tedy inhibitoru selektivně inhibující katepsiny B, což naznačuje, že za majoritní proteolytickou aktivitu při pH 5 nejsou zodpovědné proteasy typu katepsinu B, ale pravděpodobně proteasy široké podrodiny proteas typu katepsinu L. Podíl proteas podobných katepsinu B na celkové aktivitě se zvyšuje ve velmi kyselém prostředí (pH 3,0) a v silně zásaditém prostředí (pH 10,0).

Test dále prokázal velmi dobré inhibiční schopnosti cystatinu FheCy2, které byly pouze mírně redukovány v alkalické oblasti. Prakticky kompletní inhibice byla změřena v kyselé oblasti a míra inhibice postupně mírně klesala k zhruba 80% inhibici v pH 10,0.

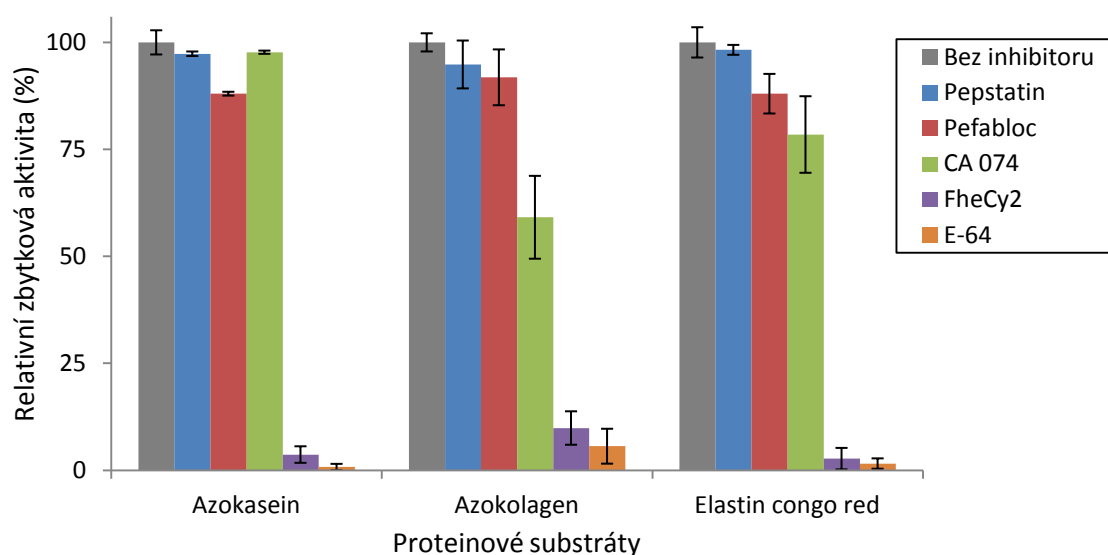


Obr. 4.4: Proteolytická degradace azokaseinu: závislosti na pH a inhibitorech cysteinových proteas. (A) Aktivita ESP sekretu z *F. hepatica* byla měřena s obecným proteinovým substrátem azokaseinem. Na ose y je relativní aktivita normalizována na nejvyšší naměřenou hodnotu (100 %). (B) Degradace azokaseinu v přítomnosti 10 μ M E-64 (modré sloupce), 0,5 μ M FheCy2 (červené) a 10 μ M CA-074 (zelené). Výsledek je vyjádřen v procentech inhibice vzhledem k neinhibované kontrole.

4.2.1.2. Proteolytická aktivita a inhibice se substráty azokolagenem a elastinem congo red

Proteolytická aktivita v ESP sekretech z *F. hepatica* byla dále analyzována pomocí dvou dalších chromogenních obecných proteinových substrátů –

azokolagenu a derivátu elastinu (elastin congo red). Kolagen a elastin, tedy nemodifikované verze těchto substrátů, tvoří převážnou část extracelulární matrix, a jsou proto fyziologicky relevantní pro *F. hepatica* a přítomné v prostředí potencionálního působení jejich ESP sekretů. Aktivita k těmto substrátům byla dále studována z pohledu inhibiční specifity s využitím série selektivních inhibitorů proteas (E-64, CA-074, pepstatin a Pefabloc) a testována byla i citlivost k inhibitoru FheCy2 z *F. hepatica*. Inhibitory byly použity v koncentracích, které jsou standardně používané pro průkaznou klasifikaci katalytického typu proteas podle inhibiční specifity ⁹². Získané výsledky pro oba substráty jsou porovnány se substrátem azokolagenem (kap. 4.2.1.1.) a jsou uvedeny v obr. 4.5.



Obr. 4.5: Proteolytická degradace proteinových substrátů a vliv inhibitorů proteas. Aktivita ESP sekretů z *F. hepatica* byla měřena s chromogenními substráty při pH 5,0. Šedý sloupec značí aktivitu ESP z *F. hepatica* bez přidaných inhibitorů, modrý obsahuje 10 μ M pepstatin, červený 100 μ M Pefabloc, zelený 10 μ M CA-074, fialový 0,5 μ M FheCy2 a oranžový 10 μ M E-64. Na ose y je vynesena zbytková relativní aktivita vzhledem k neinhibované kontrole (kompletní inhibice je 100 %).

Obecný vliv většiny inhibitorů na degradaci všech tří substrátů byl podobný, E-64 (inhibitor cysteinových proteas rodiny papainu) a FheCy2 inhibovaly takřka veškerou aktivitu, oproti tomu pepstatin (inhibitor aspartátových proteas)

nevykazoval významnou inhibici a Pefabloc (inhibitor serinových proteas) měl jen velmi malý efekt. Míra inhibice působením CA-074 (inhibitoru papainových proteas typu katepsinu B) se u jednotlivých substrátů značně liší a je výrazně oslabená pouze u azokolagenu.

Z uvedených výsledků vyplývá, že za proteolytickou aktivitu ESP sekretů z *F. hepatica* k proteinovým substrátům jsou v mírně kyselé oblasti (tj. v pH optimu) zodpovědné především cysteinové proteasy (z rodiny papainu). Dále lze předpokládat, že kromě papainových proteas typu katepsinu L jsou sekretovány také proteasy typu katepsinu B, které se mohou významně podílet na proteolýze některých proteinových substrátů, jako je např. kolagen.

4.2.2. ANALÝZA PROTEOLYTICKÉ AKTIVITY S PEPTIDOVÝMI SUBSTRÁTY

Kromě proteinových substrátů byla proteolytická aktivita v ESP sekretech z *F. hepatica* studována pomocí syntetických fluorogenních peptidových substrátů, které umožňují získat nové informace o substrátové specifitě a mnohem citlivější měření aktivit.

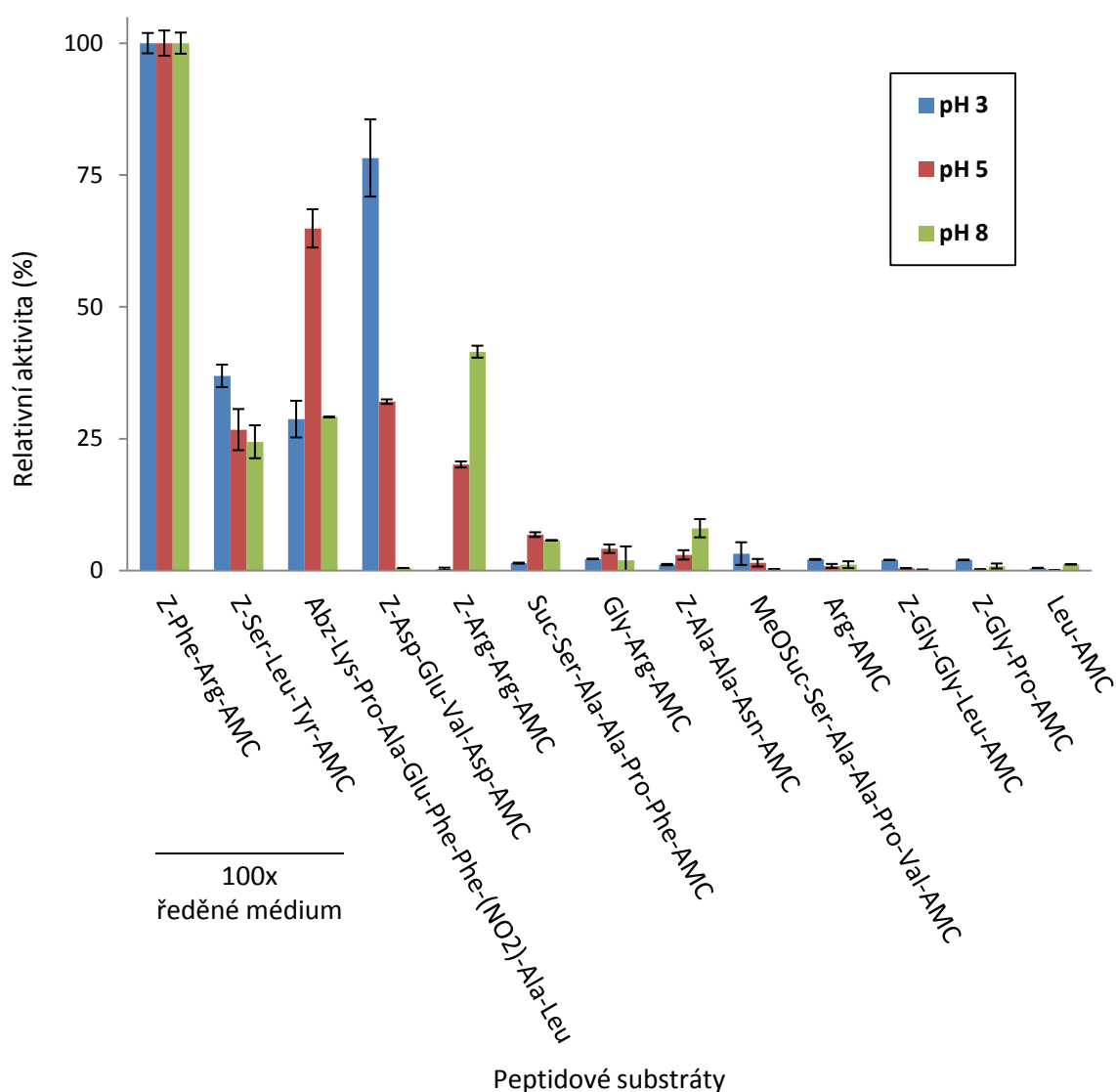
4.2.2.1. Vyhledání citlivých fluorogenních substrátů

Substrátová specifita proteas v ESP sekretech z *F. hepatica* byla analyzována se sadou syntetických peptidových fluorogenních substrátů uvedených na obr. 4.6 na str. 69. Měření byla provedena při třech hodnotách pH, které pokrývají oblast hlavní proteolytické aktivity (jak byla určena v kap. 4.2.1.).

Výsledky ukazují, že nejlépe štěpenými substráty byly Z-Phe-Arg-AMC a Z-Ser-Leu-Tyr-AMC, aktivita s těmito dvěma substráty byla o dva řády vyšší než s ostatními dobře měřitelnými substráty. Z-Phe-Arg-AMC je substrát výrazně štěpený většinou papainových proteas s endopeptidasovou aktivitou (a také serinovými proteasami trypsinového typu), Z-Ser-Tyr-AMC je substrát specifický pro kalpain. Další tři substráty s ESP byly hydrolyzovány s dobře měřitelnou

aktivitou, tyto substráty jsou citlivé pro katepsin D (Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-(NO₂)-Ala-Leu), kaspasy (Z-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) a katepsin B (Z-Arg-Arg-AMC).

U zbývajících substrátů v testované sadě byla naměřena jen slabá aktivita, a proto nebyly tyto substráty použity pro další podrobnější analýzu proteas uvedenou v následující kapitole. Je zajímavé uvést, že předběžné experimenty ukazují, že u substrátu Z-Ala-Ala-Ans-AMC používaného pro legumain je možné měřenou aktivitu zvýšit cca 8x v přítomnosti inhibitoru E-64. Tento efekt může být vysvětlen chráněním legumainu proti proteolytické degradaci papainovými proteasami.

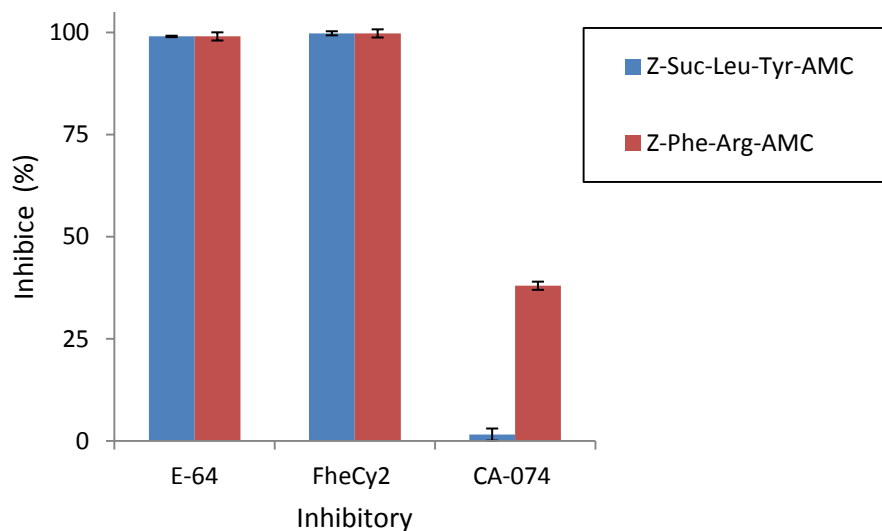


Obr. 4.6: Porovnání aktivity ESP sekretovaných proteas ke specifickým peptidovým substrátům. Aktivita ESP sekretu z *F. hepatica* byla měřena

s fluorogenními substráty při třech hodnotách pH. Modré sloupce značí aktivitu při pH 3,0, červené při pH 5,0 a zelené při pH 8,0. Na ose y je vynesena relativní aktivita normalizovaná na nejvyšší naměřenou hodnotu aktivity (100 %) v sadě substrátů při daném pH. Na ose x jsou uvedeny testované substráty. První dva substráty byly měřeny se 100x menším množstvím testovaných proteas (100x ředěné médium s ESP sekretem z *F. hepatica*).

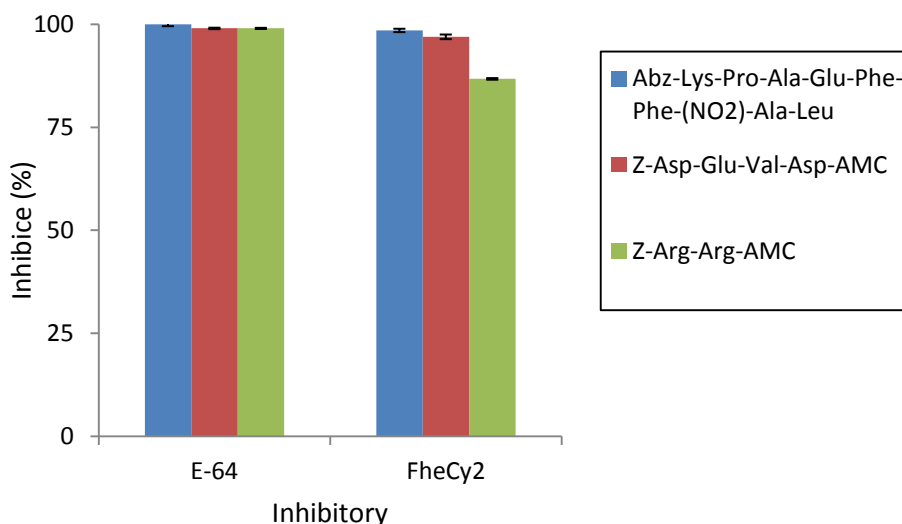
4.2.2.2. Klasifikace sekretovaných proteas podle inhibiční specifity

V testech s fluorogenními peptidovými substráty byla dále analyzována inhibiční specifita proteas v ESP sekretu z *F. hepatica* umožňující klasifikaci těchto proteas. K dostatečně aktivním substrátům (kap. 4.2.2.1.) byly v kinetickém testu přidávány specifické inhibitory cysteinových proteas a naměřené hodnoty inhibice byly vyneseny do dvou grafů. Obr. 4.7 obsahuje data pro nejcitlivější substráty Z-Suc-Leu-Tyr-AMC a Z-Phe-Arg-AMC, a obr. 4.8 na str. 71 pro substráty s nízkou citlivostí Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-(NO₂)-Ala-Leu, Z-Asp-Glu-Val-Asp-AMC a Z-Arg-Arg-AMC.



Obr. 4.7: Inhibice aktivity sekretovaných proteas měřená s vysoce citlivými substráty. Proteolytická aktivita ESP sekretů z *F. hepatica* byla měřena při pH 5,0 pomocí substrátů Z-Suc-Leu-Tyr-AMC (značen modře) a Z-Phe-Arg-AMC (červeně)

v přítomnosti inhibitorů cysteinových proteas (uvedeny na ose x: 10 μ M E-64, 10 μ M CA-074 a 0,5 μ M FheCy2). Na ose y je míra inhibice vyjádřena jako relativní inhibice aktivity vzhledem k neinhibované kontrole (kompletní inhibice je 100 %).



Obr. 4.8: Inhibice aktivity sekretovaných proteas měřená s málo citlivými substráty ESP. Proteolytická aktivita ESP sekretů z *F. hepatica* byla měřena při pH 5,0 pomocí substrátů Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-(NO₂)-Ala-Leu (značen modře), červeně Z-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (červeně) a Z-Arg-Arg-AMC (zeleně) v přítomnosti inhibitorů cysteinových proteas (uvedeny na ose x: 10 μ M E-64 a 0,5 μ M FheCy2). Na ose y je míra inhibice vyjádřena jako relativní inhibice aktivity vzhledem k neinhibované kontrole (kompletní inhibice je 100 %).

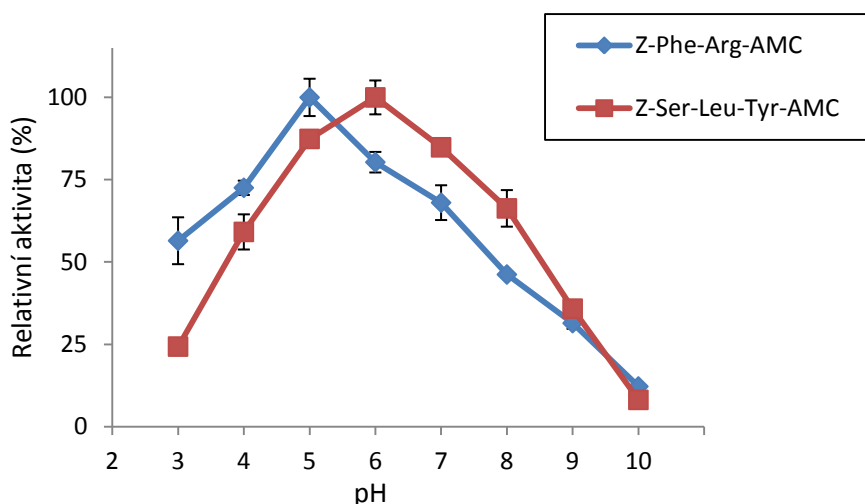
Společným rysem obou výše uvedených grafů je úplná inhibice aktivity inhibitorem E-64. Tento inhibitor specificky blokuje aktivitu cysteinových proteas z rodiny papainu. Z tohoto výsledku vyplývá, že proteolytická aktivita, která štěpí všech pět testovaných substrátů, je způsobena pouze papainovými proteasami. Substrátová specifita těchto proteas byla tedy dostatečně široká, aby zahrnovala klasické substráty pro papainové proteasy s endopeptidasovou speciditou (Z-Phe-Arg-AMC a Z-Arg-Arg-AMC), ale také substráty používané jako citlivé pro jiné typy proteas (kalpain, kaspasy).

Důležitým rozdílem mezi dvěma vysoce citlivými substráty Z-Suc-Leu-Tyr-AMC a Z-Phe-Arg-AMC je rozdílná míra inhibice působením inhibitoru CA-074, který je specifickým inhibitorem papainových proteas typu katepsinu B. Inhibice aktivity k Z-Suc-Leu-Tyr-AMC je cca 40%. Tato skutečnost naznačuje, že v ESP sekretech z *F. hepatica* není pouze jedna papainová proteasa, ale může jít o několik proteas s odlišnou substrátovou a inhibiční specifitou.

Dalším výsledkem analýzy inhibiční specifity je zjištění, že aktivita papainových proteas v ESP sekretu z *F. hepatica* je prakticky kompletně inhibována rekombinantním FheCy2 z *F. hepatica* (obr. 4.7 str. 70 a obr. 4.8 na str. 71).

4.2.2.3. Závislost aktivity hlavních cysteinových proteas na pH

Byly identifikovány dva fluorogenní peptidové substráty umožňující citlivé měření aktivity sekretovaných cysteinových proteas papainového typu a s těmito substráty byla nyní proměřena závislost proteolytické aktivity na pH (obr. 4.9). Naměřené křivky se liší v poloze pH optima, které je u substrátu Z-Suc-Leu-Tyr-AMC při pH 6,0 a u substrátu Z-Phe-Arg-AMC při pH 5,0. Tato skutečnost podporuje teorii o existenci dvou proteas nebo skupin proteas papainové rodiny, které jsou zodpovědné za hlavní proteolytickou aktivitu v ESP sekretu z *F. hepatica*.

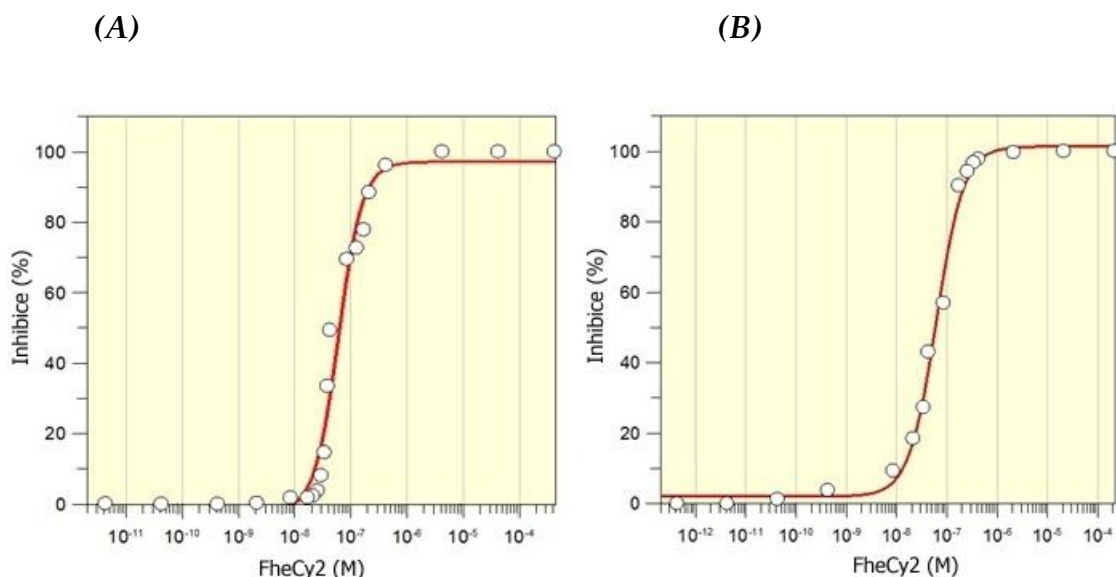


Obr. 4.9: Závislost aktivity sekretovaných proteas na pH měřená s citlivými peptidovými substráty. Proteolytická aktivita ESP sekretu z *F. hepatica* byla

měřena pomocí fluorogenních substrátů Z-Phe-Arg-AMC (značen modře) a Z-Suc-Leu-Tyr-AMC (červeně). Na ose y je relativní proteolytická aktivita normalizovaná na nejvyšší naměřenou hodnotu (100%) pro daný substrát.

4.2.2.4. Inhibice hlavních cysteinových proteas pomocí FheCy2

Pomocí kinetického testu byla měřena aktivita sekretovaných proteas v ESP sekretu z *F. hepatica* se substráty Z-Phe-Arg-AMC a Z-Suc-Leu-Tyr-AMC a její inhibice pomocí FheCy2. Byla určena hodnota IC_{50} pro oba systémy a to 60 nM pro substrát Z-Phe-Arg-AMC a FheCy2 a 61 nM pro Z-Suc-Leu-Tyr-AMC (obr. 4.10). Obě hodnoty jsou velmi podobné, cystatin FheCy2 je tedy účinným inhibitorem aktivity všech papainových proteas přítomných v ESP sekretu z *F. hepatica*.

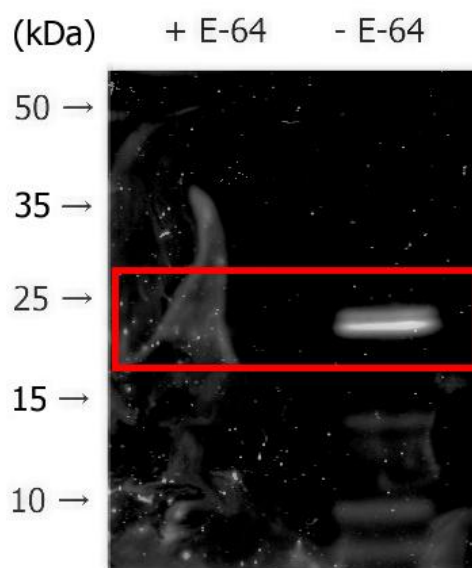


Obr. 4.10: Inhibice sekretovaných proteas pomocí FheCy2: závislost rychlosti enzymatické reakce na koncentraci FheCy2. Proteolytická aktivita ESP sekretů z *F. hepatica* byla měřena při pH 5,0 pomocí fluorogenních substrátů Z-Phe-Arg-AMC (A) a Z-Suc-Leu-Tyr-AMC (B) a v přítomnosti různých koncentrací inhibitoru FheCy2. Na ose y je míra inhibice vyjádřena jako relativní inhibice aktivity vzhledem k neinhibované kontrole (kompletní inhibice je 100 %), na ose x je vynesena koncentrace FheCy2.

4.3. VIZUALIZACE SEKRETOVANÝCH CYSTEINOVÝCH PROTEAS POMOCÍ FLUORESCENČNÍ AKTIVITNÍ ZNAČKY

Sekretované cysteinové proteasy papainového typu přítomné v ESP sekretu z *F. hepatica* byly vizualizovány pomocí proteomické technologie aktivitního značení. V prvním kroku byly proteasy značeny pomocí specifické fluorescenční aktivitní značky BoRC, následně separovány na SDS PAGE a vizualizovány pomocí fluorescenčního skeneru (obr. 4.11, str. 75). Fluorescenční reaktivní značka BoRC je specifickým ireversibilním inhibitorem proteas papainového a trypsinového typu. Značka se skládá z peptidového inhibitoru (se sekvencí Phe-Pro-Arg), který se váže do aktivního místa enzymu, a reaktivní chlormethylketonové skupiny, která kovalentně reaguje s katalytickým cysteinem proteasy. Značka dále obsahuje fluorescenční skupinu Bodipy 530/550.

Na gelu SDS PAGE byly vizualizovány dva výrazné pásy o blízkých relativních molekulových hmotnostech v oblasti kolem 25 kDa (obr. 4.11, str. 75), což odpovídá cysteinovým proteasám papainové rodiny ⁹². Minoritní pásy se také objevují v oblasti cca 8-15 kDa a mohou odpovídat proteolytickým fragmentům odvozeným ze značených proteas v průběhu reakce. Jako kontrola specifity značení pomocí BoRC byla také provedena reakce značení v přítomnosti inhibitoru E-64, který se kovalentně váže do aktivního místa papainových proteas a kompetuje tak s vazbou BoRC. Tento kontrolní experiment prokázal zhášení značení pomocí E-64 a potvrdil správnost získaných výsledků.



Obr. 4.11: Vizualizace sekretovaných papainových proteas pomocí fluorescenční aktivní značky. Syntetická aktivní značka BoRC obsahuje fluorescenční skupinu a kovalentně se váže do aktivního místa proteas. Kontrolní kompetiční zhášení bylo provedeno v přítomnosti inhibitoru E-64. Značené proteasy byly separovány na gelu SDS-PAGE a vizualizovány pomocí fluorescenčního skeneru. Pozice hlavních značených proteas jsou vyznačeny rámečkem. Uvedeny jsou relativní molekulové hmotnosti proteinových standardů.

5. DISKUZE

Hlavním cílem diplomové práce bylo určit distribuci proteas obsažených v sekretech motolice jaterní (*F. hepatica*) a analyzovat jejich potencionální interakci s FheCy2, novým proteasovým inhibitorem z rodiny cystatinů, který je exprimován *F. hepatica*.

V ESP sekretech z dospělců *F. hepatica* byla zjištěna výrazná proteolytická aktivita k obecnému proteinovému substrátu azokaseinu v širokém rozmezí pH (pH 3-10) s optimem kolem pH 5. Tato proteolytická aktivita byla také schopna fragmentovat substráty azokolagen a elastin congo red, což jsou modifikované proteiny extracelulární matrix, jejich štěpení dokazuje, že dospělci *F. hepatica* mohou účinně degradovat cílovou tkáň hostitele. Inhibitor E-64 zcela inhiboval aktivitu sekretovaných proteas ke všem třem proteinovým substrátům, studované sekrety tedy obsahují jako hlavní složku cysteinové proteasy papainové rodiny. Proteolytické aktivity k azokolagenu a částečně také k ostatním proteinovým substrátům byly do určité míry také inhibovány inhibitorem CA-074, který je selektivním inhibitorem papainových proteas typu katepsinu B. Tento výsledek naznačuje, že proteolytickou složkou sekretů dospělců jsou katepsiny B, které byly dříve identifikovány především u juvenilních stádií *F. hepatica* ^{145, 146}.

V dalším kroku byla testována sada fluorogenních peptidových substrátů a identifikovány dva vysoce citlivé substráty Z-Phe-Arg-AMC a Z-Suc-Leu-Tyr-AMC, se kterými bylo možné efektivně měřit aktivitu s minimálně o dva řády nižším množstvím proteas, než bylo nutné pro ostatní testované substráty. Tyto aktivity byly plně inhibované pomocí E-64, ale odlišovaly se citlivostí k CA-074 (inhiboval 40 % aktivity a to pouze se substrátem Z-Phe-Arg-AMC). Substrát Z-Phe-Arg-AMC je obecně štěpen papainovými proteasami typu katepsinu L a B a z uvedené analýzy vyplývá, že oba dva typy proteas jsou přítomné v testovaných sekretech. Substrát Z-Suc-Leu-Tyr-AMC není typický pro papainové proteasy, ale kalpainové proteasy. Výsledky měření inhibiční specifity s tímto substrátem ukazují, že je štěpen papainovými proteasami typu L, ale nikoli papainovými proteasami typu katepsinu

B. V P1 pozici tohoto substrátu je zbytek tyrosinu, který se strukturně výrazně odlišuje od zbytku argininu obecně preferovaného katepsinu L a B. Vysvětlení této substrátové specifity dává nedávná analýza FheCL1 (proteasy typu katepsinu L z *F. hepatica*) pomocí kombinatorních substrátových knihoven, která ukázala pro S1 vazebné podmísto širokou preferenci nejen pro bazické zbytky, ale také pro hydrofobní a aromatické zbytky v pozici P1 substrátu ¹⁴⁷.

Substráty Z-Phe-Arg-AMC a Z-Suc-Leu-Tyr-AMC jsou obecně štěpeny odlišným souborem testovaných sekretovaných proteas a toto tvrzení podporuje i odlišná závislost těchto hlavních aktivit na pH, kdy nalezené hodnoty pH optima byly při pH 6,0 resp. 5,0. Lze předpokládat, že se jedná o větší soubor izoenzymů papainových proteas, jak naznačují nové práce zabývající se proteomickou analýzou ESP sekretů z dospělců *F. hepatica*, které uvádějí 3 skupiny izoenzymů typu katepsinu L označované FheCL1, FheCL2 a FheCL5 ^{148, 149}.

Další důkaz existence několika proteas ve studovaných sekretech byl získán pomocí moderního proteomického nástroje, kterým jsou tzv. aktivitní značky („activity-based probes“) a které byly v této diplomové práci použity poprvé pro analýzu proteas sekretovaných z *F. hepatica*. Papainové proteasy byly značeny pomocí fluorescenční aktivitní značky BoRC, separovány na SDS PAGE a vizualizovány. Detekovány byly dva výrazné pásy o molekulové hmotnosti kolem 25 kDa, což odpovídá předpokládané molekulové hmotnosti pro proteasy typu katepsinu L. U rekombinantní proteasy FheCL1 byl studován proces autoaktivace, kdy neaktivní zymogen (38 kDa) byl v kyselém pH konvertován na zralou proteasu s molekulovou hmotností kolem 25 kDa ¹⁵⁰.

Dalším cílem diplomové práce bylo charakterizovat interakci studovaných sekretovaných proteas s cystatinem FheCy2. Pomocí kinetických testů se substráty Z-Phe-Arg-AMC a Z-Suc-Leu-Tyr-AMC byla změřena hodnota IC₅₀ cca 60 nM, která ukazuje, že FheCy2 je účinným inhibitorem proteolytické aktivity testovaných papainových proteas typu katepsinu L i B. Tento výsledek dále potvrzuje kompletní inhibice (pomocí 0,5 μM FheCy2) proteolytické aktivity sekretovaných proteas, která

byla testována s proteinovými substráty (včetně derivátu kolagenu a elastinu) v celé oblasti fyziologicky relevantních hodnot pH.

Z těchto výsledků vyplývá, že FheCy2 je schopný účinně inhibovat endogenní proteasy *F. hepatica* a jeho fyziologickou funkcí tedy může být regulace a ochrana tkání parazita před nežádoucí proteolýzou vlastními proteasami. Předběžná imunomikroskopická studie provedená na Univerzitě v Curychu ukazuje, že FheCy2 je výrazně lokalizován v epitelu trávicího traktu dospělců *F. hepatica* (a je také částečně sekretován), kde může regulovat aktivitu trávicích proteas, které parazit sekretuje a poté uvolňuje do okolního prostředí. Lze předpokládat, že cystatin FheCy2 bude u *F. hepatica* plnit podobné funkce jako nedávno identifikované cystatiny FgStefin-1 a FgStefin-2 z příbuzného druhu *F. gigantica*, u kterých byla zjištěna podobná lokalizace^{117, 118}.

Provedená biochemická charakterizace nového cystatinu FheCy2 z dospělců *F. hepatica* činí z tohoto proteinu potencionální molekulární cíl pro supresi *F. hepatica* pomocí vakcín využitelných ve veterinární i humánní medicíně. Další práce na tomto projektu budou směřovány na tyto vakcinační experimenty na zvířecím modelu a dále na analýzu možné interakce FheCy2 s hostitelskými proteasami a určení jeho krystalové struktury.

6. ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na biochemickou analýzu proteolytického systému parazita motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) a na potencionální mechanismy jeho inhibiční regulace.

Proteasový inhibitor FheCy2 z motolice jaterní

Nový inhibitor FheCy2 z rodiny cystatinů byl produkován jako rekombinantní protein v expresním systému kvasinky *Pichia pastoris* na spolupracujícím pracovišti Parazitologického ústavu na Univerzitě v Curychu. Pro izolaci FheCy2 z kultivačního média byl navržen chromatografický protokol založený na kombinaci gelových chromatografií a afinitní chelatační chromatografie. Purifikovaný FheCy2 byl získán ve vysoké čistotě umožňující enzymologickou analýzu a budoucí krystalizační experimenty.

Proteasy sekretované motolicí jaterní

Studovány byly proteasy z tzv. exkrečních-sekrečních produktů uvolňovaných dospělci motolice jaterní v těle hostitele. S obecným proteinovým substrátem bylo zjištěno, že sekretované proteasy jsou významně aktivní v širokém rozmezí pH (pH 3-10) s optimem kolem pH 5. Sekretované proteasy byly při pH 5 schopné degradovat chromogenní deriváty kolagenu a elastinu. Pomocí selektivních syntetických inhibitorů bylo zjištěno, že za veškerou sekretovanou proteolytickou aktivitu jsou zodpovědné cysteinové proteasy papainové rodiny.

Pro měření aktivity sekretovaných papainových proteas byly nalezeny dva vysoce citlivé fluorogenní peptidové substráty Z-Phe-Arg-AMC a Z-Ser-Leu-Tyr-AMC. Aktivity k těmto substrátům měly odlišné hodnoty pH optima (pH 5 a 6) a také rozdílnou citlivost k selektivním syntetickým inhibitorům papainových proteas. Tyto výsledky naznačují, že na aktivitě sekretovaných proteas se podílí pravděpodobně několik papainových proteas typu katepsinu L i katepsinu B.

Sekretované papainové proteasy byly elektroforeticky separovány a vizualizovány pomocí proteomické technologie aktivního značení. K tomuto účelu byla použita syntetická fluorescenční značka, která se kovalentně váže do aktivního místa papainových proteas. Vizualizovány byly minimálně dva majoritní izoenzymy v oblasti relativních molekulových hmotností kolem 25 kDa.

Interakce sekretovaných proteas s inhibitorem FheCy2

FheCy2 inhiboval kompletně proteolytickou aktivitu sekretovaných proteas v testech se všemi testovanými proteinovými substráty a identifikovanými fluorogenními peptidovými substráty. Inhibiční interakce probíhala v širokém rozmezí hodnot pH. V kinetických testech s fluorogenními peptidovými substráty byla určena hodnota $IC_{50} \sim 60$ nM.

Z těchto výsledků vyplývá, že FheCy2 je účinný inhibitor proteas motolice jaterní a jeho fyziologickou funkcí může být regulace endogenních sekretovaných proteas a ochrana tkání parazita před nežádoucí proteolýzou. Toto činí z FheCy2 atraktivní molekulární cíl pro supresi motolice jaterní a předběžné vakcinační experimenty s rekombinantním FheCy2 a zvířecím modelem v současné době probíhají na Univerzitě v Curychu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Horák, P., Volf, P. *Paraziti a jejich biologie*. 318–331, Triton: Praha (2007).
2. Jainudeen, M. R., Buick, T. D., Song, C. V. Some Clinico-Pathologic Finding in Elephants (*Elephas maximus*) Infected with *Fasciola jacksoni*. *Journal of Wildlife Diseases* **14**, 110–115 (1978).
3. Tolan, R. W. Fascioliasis Due to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Infection: An Update on This “Neglected” Neglected Tropical Disease. *Laboratory Medicine* **42**, 107–116 (2011).
4. Narva, K. M., Diaz, A. C., Claveria, F. G. Comparative morphometry of *Fasciola gigantica* (Cobbold, 1855) and *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) coexisting in Philippine Carabao (*Bubalus bubalis*). *National Research Center for Protozoan Diseases* **21**, 70–77 (2011).
5. Terasaki, K., Itagaki, T., Shibahara, T., Noda, Y. Comparative Study of the Reproductive Organs of *Fasciola* Groups by Optical Microscope. *Journal of Veterinary Medical Science* **18**, 735–742 (2001).
6. Periago, M. V, Valero, M. a, El Sayed, M., Ashrafi, K., El Wakeel, A., Mohamed, M. Y., Desquesnes, M., Curtale, F., Mas-Coma, S. First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infection, Genetics and Evolution* **8**, 51–8 (2008).
7. Amor, N., Halajian, A., Farjallah, S., Merella, P., Said, K., Ben Slimane, B. Molecular characterization of *Fasciola* spp. from the endemic area of northern Iran based on nuclear ribosomal DNA sequences. *Experimental parasitology* **128**, 196–204 (2011).
8. Itagaki, T., Kikawa, M., Sakaguchi, K., Shimo, J., Terasaki, K., Shibahara, T., Fukuda, K. Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. *Parasitology* **131**, 679–85 (2005).
9. Andrews S. J. in *Fasciolosis* (Dalton, J. P.) 1–37 (CABI publishing, 1999).

10. Dawes, B. Some observations of *Fasciola hepatica* L. during feeding operations in the hepatic parenchyma of the mouse, with notes on the nature of liver damage in this host. *Parasitology* **53**, 135–143 (1963).
11. <http://animaldiversity.org> (5. 5. 2013)
12. Mas-Coma, S., Esteban, J. G., Bargues, M. D. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization* **4**, 340–346 (1999).
13. <http://www.dpd.cdc.gov/> (5. 5. 2013)
14. http://www.bvgh.org/Portals/0/disease_maps/Fascioliasis.png (5. 5. 2013)
15. Rondelaud, D., Vignoles, P., Dreyfuss, G. *Fasciola hepatica*: the developmental patterns of redial generations in naturally infected *Galba truncatula*. *Parasitology research* **94**, 183–7 (2004).
16. Correa, A. C., Escobar, J. S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., Pointier, J.-P., Hurtrez-Boussès, S. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC evolutionary biology* **10**, 381 (2010).
17. Gutiérrez, A., Pointier, J.-P., Fraga, J., Jobet, E., Modat, S., Pérez, R. T., Yong, M., Sanchez, J., Loker, E. S., Théron, A. *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Experimental parasitology* **105**, 211–8 (2003).
18. Zukowski, S. H., Hill, J. M., Jones, F. W., Malone, J. B. Development and validation of a soil-based geographic information system model of habitat of *Fossaria bulimoides*, a snail intermediate host of *Fasciola hepatica*. *Preventive Veterinary Medicine* **11**, 221–227 (1991).
19. Mas-Coma, S., Bargues, M. D., Valero, M. a. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International journal for parasitology* **35**, 1255–78 (2005).
20. <http://www.nhm.ac.uk/> (5. 5. 2013)
21. Augot, D., Rondelaud, D., Cercarial productivity of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea truncatula* during usual and unusual development of redial generations. *Parasitology Research* **87**, 631–633 (2001).

22. Arjona, R., Riancho, J. A., Aguado, J. M., Salesa, R., González-Macías, J. Fascioliasis in developed countries: a review of classic and aberrant forms of the disease. *Medicine* **74**, 13–22 (1995).
23. Makay, O., Gurcu, B., Caliskan, C., Nart, D., Tuncyurek, M., Korkut, M. Ectopic fascioliasis mimicking a colon tumor. *World journal of gastroenterology* **13**, 2633–5 (2007).
24. Dalimi, A., Jabarvand, M. Fasciola hepatica in the human eye. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **99**, 798–800 (2005).
25. Vatsal, D. K., Kapoor, S., Venkatesh, V., Vatsal, P., Husain, N. Ectopic fascioliasis in the dorsal spine: case report. *Neurosurgery* **59**, 706–712 (2006).
26. Cheng, A. C., Zakhidov, B. O., Babadjonova, L. J., Rogers, N. K., McCollum, C. J., Hillyer, G. V, Thielman, N. M. A 6-year-old boy with facial swelling and monocular blindness. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **45**, 1207, 1238–9 (2007).
27. Mehra, U. R., Verma, A. K., Dass, R. S., Sharma, R. L., Yadav, S. C. Effects of Fasciola gigantica infection on growth and nutrient utilisation of buffalo calves. *The Veterinary record* **145**, 699–702 (1999).
28. Mas-coma, S. Human Fascioliasis: Epidemiological Patterns in Human Endemic Areas of South America, Africa and Asia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **35**, 1–11 (2003).
29. Torgerson, P. C. J. in *Fasciolosis* 113–49 (1999).
30. Mitchell, G. Update on fasciolosis in cattle and sheep. *In Practice* **24**, 378–385 (2002).
31. Mas-Coma, S., Anglés, R., Esteban, J. G., Bargues, M. D., Buchon, P., Franken, M., Strauss, W. The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Tropical medicine & international health: TM & IH* **4**, 454–67 (1999).
32. Parkinson, M., O'Neill, S. M., Dalton, J. P. Endemic human fasciolosis in the Bolivian Altiplano. *Epidemiology and infection* **135**, 669–74 (2007).
33. Korkmaz M., Saba R. Human Fascioliasis. *Clinical Microbiology Newsletter* **27**, 27–34 (2005).

34. Sithithaworn P., Haswell-Elkins M., Mairiang P., Soisungwan S. Parasite-associated morbidity: Liver fluke infection and bile duct cancer in northeast Thailand. *International journal for parasitology* **24**, 833–843 (1994).
35. Robinson, M. W., Dalton, J. P. Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiasis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **364**, 2763–76 (2009).
36. http://en.wikipedia.org/wiki/File:F._hepatica_hypertrophica_of_bile_duct.jpg (5. 5. 2013)
37. Valero, M. A., Periago, M. V., Pérez-Crespo, I., Angles, R., Villegas, F., Aguirre, C., Strauss, W., Espinoza, J. R., Herrera, P., Terashima, A., Tamayo, H., Engels, D., Gabrielli, A. F., Mas-Coma, S. Field evaluation of a coproantigen detection test for fascioliasis diagnosis and surveillance in human hyperendemic areas of andean countries. *PLoS neglected tropical diseases* **6**, 1–11 (2012).
38. Young, A. R., Barcham, G. J., McWilliam, H. E., Piedrafita, D. M., Meeusen, E. N. Galectin secretion and binding to adult *Fasciola hepatica* during chronic liver fluke infection of sheep. *Veterinary immunology and immunopathology* **145**, 362–7 (2012).
39. Demerdash, Z., Diab, T. M., Aly, I. R., Mohamed, S. H., Mahmoud, F. S., Zoheiry, M. K., Mansour, W., Attia, M. E., El-Bassiouny, A. E. Diagnostic efficacy of monoclonal antibody based sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Fasciola gigantica* excretory/secretory antigens in both serum and stool. *Parasites & vectors* **4**, 1–7 (2011).
40. El-Rahimy, H. H., Mahgoub, A. M. a, El-Gebaly, N. S. M., Mousa, W. M. a, Antably, A. S. a E. Molecular, biochemical, and morphometric characterization of *Fasciola* species potentially causing zoonotic disease in Egypt. *Parasitology research* **111**, 1103–11 (2012).
41. Wongba, N., Thaewongiew, K., Phathee, K., Laithavewat, L., Duangsong, R., Promthet, S., Tangsawad, S. Liver fluke prevention and control in the northeast of Thailand through action research. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **12**, 1367–70 (2011).
42. Fairweather, I., Boray, J. C. Fasciolicides: Efficacy , Actions , Resistance and its Management. *The Veterinary Journal* **158**, 81–112 (1999).

43. Barduagni, P., Hassanein, Y., Mohamed, M., Wakeel, A. El, Sayed, M. El, Hallaj, Z., Curtale, F. Use of triclabendazole for treatment of patients co-infected by *Fasciola* spp. and *S. mansoni* in Behera Governorate, Egypt. *Parasitology research* **102**, 631–3 (2008).
44. Overend, D. J., Bowen, F. L. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian veterinary journal* **72**, 275–6 (1995).
45. Diaz, A. V, Netherton, C. L., Dixon, L. K., Wilson, A. J., Rj, R., Michaud, V., Heath, L., Hutchings, G., Oura, C., Vosloo, W. Apparent Resistant Human *Fasciola hepatica* Infection , the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* **18**, 1028–1029 (2012).
46. Farid, Z., Kamal, M., Mansour, N. Praziquantel and *Fasciola hepatica* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **83**, 813 (1989).
47. Price, T. A., Tuazon, C. U., Simon, G. L. Fascioliasis: case reports and review. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **17**, 426–30 (1993).
48. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/32802> (5. 5. 2013)
49. Greenberg, R. M. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? *International journal for parasitology* **35**, 1–9 (2005).
50. Davies J. S. *Amino Acids, Peptides and Proteins*. 35-76 (Royal Society of Chemistry, 2006).
51. Karlson, P. *Základy biochemie*. 198–211 (Academia, 1971).
52. Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature reviews. Drug discovery* **5**, 85–99 (2006).
53. Rawlings, N. D., Barrett, a J. Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical journal* **290**, 205–218 (1993).
54. Rawlings, N. D., Tolle, D. P., Barrett, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *The Biochemical journal* **378**, 705–716 (2004).
55. <http://merops.sanger.ac.uk> (1. 4. 2013)
56. Vodrážka, Z. *Biochemie*. 223–267 (Academia, 1996).

57. Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews* **102**, 4501–4524 (2002).
58. Dunn, B. M. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical reviews* **102**, 4431–4458 (2002).
59. Rubin, D. M., Finley, D. The proteasome: a protein-degrading organelle? *Current Biology* **5**, 1–5 (1995).
60. Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533–549 (1995).
61. Fujinaga, M., Cherney, M. M., Oyama, H., Oda, K., James, M. N. G. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3364–3379 (2004).
62. Neil D. Rawlings, A. J. B. in *Handbook of Proteolytic Enzymes (second edition)* 325–370 (2004).
63. Influence of EDTA and metal ions on a metalloproteinase from *Pseudomonas fluorescens* biotype I. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* **368**, 57–61 (1987).
64. Chapman, H. A., Riese, R. J., Shi, G. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annual Review of Physiology* **59**, 63–88 (1997).
65. Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Bateman, A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids research* **38**, 227–233 (2010).
66. Bühling, F., Fengler, A., Brandt, W., Welte, T., Ansorge, S., Nägler, D. K. Review: novel cysteine proteases of the papain family. *Advances in experimental medicine and biology* **477**, 241–254 (2000).
67. Harrison, M. J., Burton, N. a., Hillier, I. H. Catalytic Mechanism of the Enzyme Papain: Predictions with a Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Potential. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 12285–12291 (1997).
68. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5c/Cysteinprotease_Reaktionsmechanismus.svg/2000pxcysteinprotease_Reaktionsmechanismus.svg.png (5. 3. 2013)

69. Ménard, R., Carrière, J., Laflamme, P., Plouffe, C., Khouri, H. E., Vernet, T., Tessier, D. C., Thomas, D. Y., Storer, A. C. Contribution of the glutamine 19 side chain to transition-state stabilization in the oxyanion hole of papain. *Biochemistry* **30**, 8924–8938 (1991).
70. Schechter, I., Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **27**, 157–162 (1967).
71. Ondetti, M. A., Cushman, D. W. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual review of biochemistry* **51**, 283–308 (1982).
72. Vihinen, P., Kähäri, V.-M. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **99**, 157–166 (2002).
73. Strooper, B. D. E. Proteases and Proteolysis in Alzheimer Disease: A Multifactorial View on the Disease Process. *Physiological Reviews* **90**, 465–494 (2010).
74. Atkinson, H. J., Babbitt, P. C., Sajid, M. The global cysteine peptidase landscape in parasites. *Trends in parasitology* **25**, 573–581 (2009).
75. Sajid, M., McKerrow, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and biochemical parasitology* **120**, 1–21 (2002).
76. He, Y.-X., Chen, L., Ramaswamy, K. *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum*: early events associated with penetration and migration of schistosomes through human skin. *Experimental Parasitology* **102**, 99–108 (2002).
77. Lambertucci, J. R. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **25**, 399–404 (1993).
78. McKerrow, J. H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., Sajid, M. Proteases in parasitic diseases. *Annual review of pathology* **1**, 497–536 (2006).
79. Moczon, T., Wranicz, M. *Trichinella spiralis*: proteinases in the larvae. *Parasitology research* **85**, 47–58 (1999).
80. Koblinski, J. E., Ahram, M., Sloane, B. F. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **291**, 113–135 (2000).

81. Armstrong, P. B. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology* **211**, 263–281 (2006).
82. Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Dalton, J. P., Goñi, F. Fasciola hepatica: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Experimental parasitology* **94**, 99–110 (2000).
83. Fagbemi, B. O., Hillyer, G. V. The purification and characterization of a cysteine protease of Fasciola gigantica adult worms. *Veterinary parasitology* **43**, 223–232 (1992).
84. Draper, D., Donohoe, W., Mortimer, L., Heine, R. P. Cysteine proteases of Trichomonas vaginalis degrade secretory leukocyte protease inhibitor. *The Journal of Infectious Diseases* **178**, 815–819 (1998).
85. Williamson, A. L., Lecchi, P., Turk, B. E., Choe, Y., Hotez, P. J., McKerrow, J. H., Cantley, L. C., Sajid, M., Craik, C. S., Loukas, A. A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *The Journal of biological chemistry* **279**, 35950–35957 (2004).
86. Williamson, A. L., Brindley, P. J., Knox, D. P., Hotez, P. J., Loukas, A. Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends in Parasitology* **19**, 417–423 (2003).
87. Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdusek, O., Caffrey, C. R., Mares, M., Kopáček, P. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick Ixodes ricinus reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasites & vectors* **1**, 7–14 (2008).
88. Brindley, P. J., Kalinna, B. H., Dalton, J. P., Day, S. R., Wong, J. Y., Smythe, M. L., McManus, D. P. Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Molecular and biochemical parasitology* **89**, 1–9 (1997).
89. Francis, S. E., Sullivan, D. J., Goldberg, D. E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Annual review of microbiology* **51**, 97–123 (1997).
90. Rascón, A., Gearin, J., Isoe, J., Miesfeld, R. L. In vitro activation and enzyme kinetic analysis of recombinant midgut serine proteases from the Dengue vector mosquito Aedes aegypti. *BMC biochemistry* **12**, 43–57 (2011).

91. Vizioli, J., Catteruccia, F., Torre, A., Reckmann, I., Müller, H. M. Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. *European journal of biochemistry / FEBS* **268**, 4027–4035 (2001).
92. Horn, M., Nussbaumerová, M., Sanda, M., Kovárová, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C. R., Kopáček, P., Mares, M. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chemistry and biology* **16**, 1053–1063 (2009).
93. Goldberg, D. E., Slater, a F., Cerami, a, Henderson, G. B. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 2931–2945 (1990).
94. Meemon, K., Khawsuk, W., Sriburee, S., Meepool, A., Sethadavit, M., Sansri, V., Wanichanon, C., Sobhon, P. *Fasciola gigantica*: histology of the digestive tract and the expression of cathepsin L. *Experimental parasitology* **125**, 371–379 (2010).
95. Williamson, A. L., Lecchi, P., Turk, B. E., Choe, Y., Hotez, P. J., McKerrow, J. H., Cantley, L. C., Sajid, M., Craik, C. S., Loukas, A. A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *The Journal of biological chemistry* **279**, 35950–35957 (2004).
96. Gluzman, I. Y., Francis, S. E., Oksman, a, Smith, C. E., Duffin, K. L., Goldberg, D. E. Order and specificity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway. *The Journal of clinical investigation* **93**, 1602–1608 (1994).
97. Marcilla, a, De la Rubia, J. E., Sotillo, J., Bernal, D., Carmona, C., Villavicencio, Z., Acosta, D., Tort, J., Bornay, F. J., Esteban, J. G., Toledo, R. Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **15**, 95–100 (2008).
98. Berasaín, P., Goñi, F., McGonigle, S., Dowd, A., Dalton, J. P., Frangione, B., Carmona, C. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *The Journal of parasitology* **83**, 1–5 (1997).
99. Halton, D. Nutritional adaptations to parasitism within the Platyhelminthes. *International Journal for Parasitology* **27**, 693–704 (1997).

100. Cervi, L., Rubinstein, H., Masih, D. T. Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing suppression of the cellular immune responses. *Veterinary parasitology* **61**, 97–111 (1996).
101. Goose, J. Possible role of excretory/secretory products in evasion of host defences by *Fasciola hepatica*. *Nature* **275**, 216–217 (1978).
102. Serradell, M. C., Guasconi, L., Cervi, L., Chiapello, L. S., Masih, D. T. Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Veterinary immunology and immunopathology* **117**, 197–208 (2007).
103. Hillyer, G. V., Soler de Galanes, M., Battisti, G. *Fasciola hepatica*: host responders and nonresponders to parasite glutathione S-transferase. *Experimental parasitology* **75**, 176–186 (1992).
104. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayers, P. A., Rodwell, V. W. *Harper ' s Illustrated Biochemistry*. 72–80, The McGraw-Hill Companies: New York 2003.
105. Hozumi, M., Ogawa, M., Sugimura, T., Takeuchi, T., Umezawa, H. Inhibition of Tumorigenesis in Mouse Skin by Leupeptin , a Protease Inhibitor from Actinomycetes Inhibition of Tumorigenesis in Mouse Skin by Leupeptin , a Protease Inhibitor from A ctinomycetes. *Cancer research* **32**, 1725–1728 (1972).
106. Kominami, E. Inhibitions by E-64 Derivatives of Rat Liver Cathepsin B and Cathepsin L in Vitro and In vivo. *Journal of biochemistry* **88**, 1805–1811 (1980).
107. Powers, J. C., Asgian, J. L., Ekici, O. D., James, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemical reviews* **102**, 4639–4750 (2002).
108. Rzychon, M., Chmiel, D., Stec-Niemczyk, J. Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta biochimica Polonica* **51**, 861–873 (2004).
109. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. *Molecular Cell Biology*. 244–287, Freeman: New York, (2000).
110. Benchabane, M., Schlüter, U., Vorster, J., Goulet, M.-C., Michaud, D. Plant cystatins. *Biochimie* **92**, 1657–1666 (2010).
111. Habib, H., Fazili, K. M. Plant protease inhibitors : a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* **2**, 68–85 (2007).

112. Abboud, R. T., Vimalanathan, S. Pathogenesis of COPD . Part I . The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **12**, 361–367 (2008).
113. Bitoun, E., Chavanas, S., Irvine, A. D., Lonie, L., Bodemer, C., Paradisi, M., Hamel-Teillac, D., Ansai, S., Mitsuhashi, Y., Taïeb, A., De Prost, Y., Zambruno, G., Harper, J. I., Hovnanian, A. Netherton syndrome: disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families. *The Journal of investigative dermatology* **118**, 352–361 (2002).
114. Spielman, A., Ribeiro, J. M., Makoul, G. T., Levine, J., Robinson, D. R. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *The Journal of Experimental Medicine* **161**, 332–344 (1985).
115. Leid, R. W., Grant, R. F., Suquet, C. M. Inhibition of neutrophil aggregation by taeniaestatin, a cestode proteinase inhibitor. *International Journal for Parasitology* **17**, 1349–1353 (1987).
116. Knox, D. P. Proteinase inhibitors and helminth parasite infection. *Parasite immunology* **29**, 57–71 (2007).
117. Siricoon, S., Grams, S. V., Grams, R. Efficient inhibition of cathepsin B by a secreted type 1 cystatin of *Fasciola gigantica*. *Molecular and biochemical parasitology* 1–8 (2012).
118. Turk, M., Grams, V.S., Grams V.R., Type I cystatin (stefin) is a major component of *Fasciola gigantica* excretion/secretion product. *Molecular & Biochemical Parasitology* **167**, 60–71 (2009).
119. Brown, W. M., Dziegielewska, K. M. Friends and relations of the cystatin superfamily - new members and their evolution. *Protein science* **6**, 5–12 (1997).
120. Fossum, K., Whitaker, J. R. Ficin and papain inhibitor from chicken egg white. *Archives of biochemistry and biophysics* **125**, 367–375 (1968).
121. Tsigou, E., Psallida, V., Demponeras, C., Boutzouka, E., Baltopoulos, G. Role of new biomarkers: functional and structural damage. *Critical care research and practice* **2013**, 361–378 (2013).

122. Janowski, R., Abrahamson, M., Grubb, A., Jaskolski, M. Domain swapping in N-truncated human cystatin C. *Journal of molecular biology* **341**, 151–160 (2004).
123. Turk, V., Stoka, V., Turk, D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**, 5406–5420 (2008).
124. Gregory, W. F., Maizels, R. M. Cystatins from filarial parasites: Evolution, adaptation and function in the host-parasite relationship. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 1389–1398 (2008).
125. Bobek, L. A., Levine, M. J. Cystatins - Inhibitors of Cysteine Proteinases. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **3**, 307–332 (1992).
126. Kolodziejczyk, R., Michalska, K., Hernandez-Santoyo, A., Wahlbom, M., Grubb, A., Jaskolski, M. Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *The FEBS journal* **277**, 1726–1737 (2010).
127. Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikovl, A., Brzin, J., Kos, J., Turk, V. The 2.0 Å X-ray structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *The EMBO journal* **7**, 2593–2599 (1988).
128. Alvarez-fernandez, M., Barrett, A. J., Gerhartz, B., Dando, P. M., Ni, J. Inhibition of Mammalian Legumain by Some Cystatins Is Due to a Novel Second Reactive Site. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 19195–19203 (1999).
129. Sokol, J. P., Schiemann, W. P. Cystatin C Antagonizes Transforming Growth Factor β Signaling in Normal and Cancer Cells 1 1 Start-up fund from the National Jewish Medical and Research Center and by a grant from the Elsa U . Pardee Foundation to W . Schiemann . Cystatin C Antagonizes Tr. *Molecular Cancer Research* **2**, 183–195 (2004).
130. Järvinen, M., Rinne, A., Hopsu-Havu, V. K. Human cystatins in normal and diseased tissues - a review. *Acta histochemica* **82**, 5–18 (1987).
131. Hsu, S. J., Nagase, H., Balmain, A. Identification of Fetuin-B as a member of a cystatin-like gene family on mouse chromosome 16 with tumor suppressor activity. *Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil national de recherches Canada* **47**, 931–946 (2004).

132. Magister, Š., Kos, J. Cystatins in Immune System. *Journal of Cancer* **4**, 45–56 (2013).
133. Klotz, C., Ziegler, T., Daniłowicz-Luebert, E., Hartmann, S. Cystatins of parasitic organisms. *Advances in experimental medicine and biology* **712**, 208–221 (2011).
134. Hashmi, S., Zhang, J., Oksov, Y., Ji, Q., Lustigman, S. The *Caenorhabditis elegans* CPI-2a cystatin-like inhibitor has an essential regulatory role during oogenesis and fertilization. *The Journal of biological chemistry* **281**, 28415–28429 (2006).
135. Maizels, R. M., Yazdanbakhsh, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature reviews. Immunology* **3**, 733–744 (2003).
136. Vray, B., Hartmann, S., Hoebeke, J. Immunomodulatory properties of cystatins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **59**, 1503–1512 (2002).
137. Sun, Y., Liu, G., Li, Z., Chen, Y., Liu, Y., Liu, B., Su, Z. Modulation of dendritic cell function and immune response by cysteine protease inhibitor from murine nematode parasite *Heligmosomoides polygyrus*. *Immunology* **138**, 370–381 (2013).
138. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/rpmi-media.html> (5. 5. 2013)
139. Laemmli, U. K. :Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5 (1970).
140. Blakesley, R. W., Boezi, J. A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G250. *Analytical biochemistry* **82**, 580–2 (1977).
141. Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–99 (1987).
142. Kawabatal, S., Miura, T., Morita, T., Kato, H., Fujikawa, K., Iwanaga, S. Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin. *European journal of biochemistry / FEBS* **25**, 17–25 (1988).

143. Fleminger, G., Carmel, a, Goldenberg, D., Yaron, a. Fluorogenic substrates for bacterial aminopeptidase P and its analogs detected in human serum and calf lung. *European journal of biochemistry / FEBS* **125**, 609–615 (1982).
144. Gasteiger, E. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* **31**, 3784–3788 (2003).
145. Robinson, M. W., Dalton, J. P., Donnelly, S. Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends in biochemical sciences* **33**, 601–608 (2008).
146. McVeigh, P., Maule, A. G., Dalton, J. P., Robinson, M. W. Fasciola hepatica virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **14**, 301–310 (2012).
147. Stack, C. M., Caffrey, C. R., Donnelly, S. M., Seshadri, A., Lowther, J., Tort, J. F., Collins, P. R., Robinson, M. W., Xu, W., McKerrow, J. H., Craik, C. S., Geiger, S. R., Marion, R., Brinen, L. S., Dalton, J. P. Structural and functional relationships in the virulence-associated cathepsin L proteases of the parasitic liver fluke, Fasciola hepatica. *The Journal of biological chemistry* **283**, 896–908 (2008).
148. Robinson, M. W., Tort, J. F., Lowther, J., Donnelly, S. M., Wong, E., Xu, W., Stack, C. M., Padula, M., Herbert, B., Dalton, J. P. Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen Fasciola hepatica: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**, 11–23 (2008).
149. Morphew, R. M., Wright, H. a, LaCourse, E. J., Woods, D. J., Brophy, P. M. Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke Fasciola hepatica in sheep host bile and during in vitro culture ex host. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**, 63–72 (2007).
150. Lowther, J., Robinson, M. W., Donnelly, S. M., Xu, W., Stack, C. M., Matthews, J. M., Dalton, J. P. The importance of pH in regulating the function of the Fasciola hepatica cathepsin L1 cysteine protease. *PLoS neglected tropical diseases* **3**, 33–36(2009).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
S adresou			